

**O EFEITO VASORRELAXANTE INDUZIDO POR
EXTRATOS DE *Euterpe edulis* Mart. ENVOLVE MÚTIPLAS VIAS
DE TRANSDUÇÃO ENDOTELIAIS**

Danillo Macêdo Gomes

**O EFEITO VASORRELAXANTE INDUZIDO POR
EXTRATOS DE *Enterpe edulis* Mart. ENVOLVE MÚLTIPLAS VIAS
DE TRANSDUÇÃO ENDOTELIAIS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.

Orientador: José Eduardo da Silva
Santos.

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gomes, Danilo Macêdo

O efeito vasorrelaxante induzido por extratos de
Euterpe edulis Mart. envolve múltiplas vias de transdução
endoteliais / Danilo Macêdo Gomes ; orientador, José
Eduardo da Silva Santos - Florianópolis, SC, 2016.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

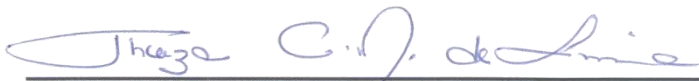
1. Farmacologia. 2. Tônus vascular. 3. Endotélio. 4.
Vasorrelaxamento. I. Santos, José Eduardo da Silva. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

"O efeito vasorrelaxante induzido por extratos de *Euterpe edulis* Mart. envolve múltiplas vias de transdução endoteliais"

Por

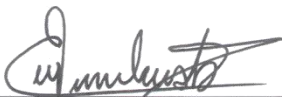
Danillo Macêdo Gomes

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (07/PPGPMC/2016) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr(a) José Eduardo da Silva Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) André Sampaio Pupo (Universidade Estadual Paulista)



Dr(a) Adair Roberto Soares dos Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Jamil Assreuy Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 29 de fevereiro de 2016.

Este trabalho é dedicado a todos
aqueles que não se contentam em viver
uma vida vazia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas e instituições que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, especialmente:

Aos meus pais, Eliane e Ari, pelo apoio e incentivo constantes nesta trajetória, bem como aos meus tios e tias Bernardete, Edison, Hubert, Neves e a minha avó, Lindalva.

À UFSC, pelas oportunidades de aprendizado e a todos os professores e alunos que fizeram ou fazem o Programa de Pós-Graduação em Farmacologia existir.

Ao professor José Eduardo da Silva Santos, pela sua dedicada orientação, competência e pelas oportunidades de pesquisa e aprendizado repassados ao longo desses dois anos de convívio.

Ao professor Jamil Assreuy Filho pelo aceite inicial em me orientar neste programa de pós-graduação e pela sua atenção e generosidade oferecidas sempre que batida à sua porta.

À professora Áurea Elizabeth Linder por sempre disponibilizar o seu laboratório para estudos ou realização de experimentos e também pela sua confiança e atenção sempre oferecidas.

À Adriane Madeira, por toda a ajuda prestada, pelo seu bom humor contagiante e por todas as festas de São João realizadas em seu domicílio, sempre regadas a quentão.

À Angélica Bernardelli e Elaine Anton, pela ajuda e incentivo dados na reta final deste trabalho e além.

Ao Felipe Vanz, pela amizade e pelos wheys divididos.

À Muryl Gonçalves, pela receptividade quando da minha chegada na pós, à Verônica Horewicz pelo aceite em compor a banca examinadora deste trabalho e à Flora Lucena, por ter sido um exemplo para mim.

Aos colegas de laboratório, Daiana Vogel, Karla Guarido, Priscila de Souza, Rita Vilhena, Ronald Gonçalves, Rui Ascenso e Thiago Correa, pelo apoio científico e pelo convívio diário.

Aos professores Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e Marcelo Maraschin, por cederem os extratos para a realização deste estudo, bem como a todos os envolvidos no grupo de pesquisa da planta *Euterpe edulis* Mart.

Aos professores que compuseram a banca examinadora, Adair Roberto Soares dos Santos e André Sampaio Pupo, pelas contribuições ou apontamentos para este trabalho.

Aos professores da graduação, Eduardo de Jesus Oliveira e Bagnólia Araújo Costa, pelo incentivo para o meu ingresso neste programa.

À Diana Carneiro, por autorizar o uso da ilustração botânica da planta *Enterpe edulis* Mart.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia.

Aos animais, que deram suas vidas em troca do meu conhecimento.

E ao CNPq, pelo apoio financeiro (402539/2013-3).

“Nunca é alto o preço a se pagar pelo
privilégio de pertencer a si mesmo”
(Nietzsche)

RESUMO

Avaliamos o efeito vasorrelaxante induzido por onze extratos obtidos da planta *Enterpe edulis* Mart. (popularmente conhecida como Juçara) e seus mecanismos de ação em aorta isolada de ratos Wistar. Um dos extratos, denominado EAP 1.180, foi selecionado para a condução do estudo por ser o mais potente e eficaz quanto ao seu efeito vasorrelaxante, e o mais otimizado quanto ao teor de compostos fenólicos totais. O extrato não alterou a função de células endoteliais e de músculo liso vascular frente a agentes vasoativos, e não gerou tolerância ao seu efeito. O relaxamento induzido pelo EAP 1.180 foi dependente do endotélio e mediado pela ativação da via da óxido nítrico sintase/guanilato ciclase solúvel/proteína cinase G, ativação não específica de canais para potássio, ativação da via da fosfatidilinositol-3-cinase/proteína cinase B, e sensível ao estado redox celular. Os resultados obtidos apontam que o extrato EAP 1.180 apresenta constituintes bioativos capazes de promover vasorrelaxamento por múltiplas vias de transdução presentes no endotélio e servem de suporte para estudos subsequentes necessários para avaliação dos mecanismos envolvidos. Novos ensaios precisam ser realizados com frações obtidas a partir do EAP 1.180 visando a caracterização da(s) substância(s) responsável(is) pelos efeitos descritos neste estudo, bem como a avaliação de parâmetros hemodinâmicos em modelos experimentais in vivo.

Palavras-chave: 1. Tônus vascular. 2. Endotélio. 3. Vasorrelaxamento.

ABSTRACT

We evaluated the vasorelaxant effect induced by eleven extracts of *Enterpe edulis* Mart. plant (popularly known as Juçara), and its mechanisms of action in the rat aortic ring assay. Among these extracts, EAP 1.180 was selected to conduct the study since it was the most potent and effective as vasorelaxant, and possessed higher amounts of phenolic compounds. The extract did not impair the functionality of endothelial cells and smooth muscle cells regarding their reactivity to vasoactive agents, and did not generate tolerance. The relaxation induced by EAP 1.180 was fully dependent on endothelial function, activation of the nitric oxide synthase/soluble guanylate cyclase/protein kinase G pathway, opening of potassium channels, stimulation of phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathway, and showed sensitive to the redox state. The results indicate that EAP 1.180 presents bioactive constituents that promote vasorelaxation by multiple transduction pathways found in endothelium, supporting the development of additional studies to assess the mechanisms involved. New approaches must be conducted in order to characterize the substance (or substances) responsible for the effects described in this study, as well as to evaluate hemodynamic parameters in in vivo experimental models.

Keywords: 1. Vascular tone. 2. Endothelium. 3. Vasorelaxation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais fatores indutores para o desenvolvimento de hipertensão arterial e doenças associadas	26
Figura 2 - Principais classes de anti-hipertensivos comercialmente disponíveis no Brasil e suas possíveis combinações	29
Figura 3 - Entidades moleculares lançadas nos Estados Unidos entre os anos de 2002-2011.....	31
Figura 4 - Mecanismos gerais de ação mediados pelos polifenóis.....	33
Figura 5 - Juçara (<i>Euterpe edulis</i> Mart.)	35
Figura 6 - Áreas e atividades desenvolvidas pela equipe da proposta de trabalho.....	39
Figura 7 - Extratos de <i>Euterpe edulis</i> Mart. avaliados	40
Figura 8 - Representação esquemática de uma cuba para sistema de órgão isolado.....	44
Figura 9 - Esquema representativo do protocolo de avaliação de viabilidade e estabilização dos anéis de aorta, comum a todos os experimentos.....	45
Figura 10 - Relações concentração-efeito para os extratos de <i>Euterpe edulis</i> Mart. obtidos por diferentes metodologias de extração.....	52
Figura 11 - Efeito da exposição pelo extrato EAP 1.180 sobre a reatividade vascular à fenilefrina e acetilcolina	53
Figura 12 - Relações concentração-efeito para preparações unicamente e repetidamente expostas ao extrato EAP 1.180	54
Figura 13 - Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com antagonista do óxido nítrico, inibidor da óxido nítrico sintase, inibidor da guanilato ciclase solúvel ou inibidor da proteína cinase G	56
Figura 14 - Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com inibidor não seletivo da cicloxigenase	57
Figura 15 - Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com bloqueador não seletivo de canais para potássio	58
Figura 16 - Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com bloqueadores seletivos de canais para potássio	60
Figura 17 - Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com antagonistas da acetilcolina, bradicinina ou histamina.....	62
Figura 18 - Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com inibidores da PI3K ou AKT	63

Figura 19 - Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com inibidores do mTOR ou AMPK ..	64
Figura 20 - Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com os antioxidantes acetovanilona, superóxido dismutase ou tempol.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alguns fármacos, análogos ou derivados de constituintes naturais obtidos de plantas, com ação ou uso clínico no sistema cardiovascular.....	30
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da pressão arterial de acordo com a OMS.....	26
Tabela 2 - Clasificação da pressão arterial de acordo com a DBH VI	27
Tabela 3 - Impacto de algumas modificações de estilo de vida na redução da pressão arterial	28
Tabela 4 - Logaritmo da concentração efetiva mediana (LogCE ₅₀) e efeito máximo (E _{max}) para extratos de <i>Euterpe edulis</i> Mart. obtidos por diferentes metodologias	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP – Fampridina
ACh – Acetilcolina
AKT – Proteína cinase B
AKTi-1/2 – 1,3- Diidro-1-((4-(6-fenil-1H-imidazo [4,5-g] quinoxalina-7) fenil) metil)- 4-piperidina)-2H-benzimidazolona-2
AMPc – Monofosfato de adenosina cíclica
AMPK – Proteína cinase ativada por AMP
ANOVA – Análise de variância
APA – Apamina
AT₁ – Receptor do subtipo AT₁ para angiotensina 2
ATP – Trifosfato de adenosina
ATR – Atropina
AV – Acetovanilona
BK_{Ca} – Canal para potássio de alta condutância sensível ao cálcio
BLT – Bilitranslocase
CCA – Centro de Ciências Agrárias
CCB – Centro de Ciências Biológicas
CCE – Curva Concentração-Efeito
CE₅₀ – Concentração efetiva mediana
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA – Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
COX – Cicloxigenase
CpC – Composto C
c-PTIO – Carboxi-PTIO
DBH VI – VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão
DCV – Doença cardiovascular
EAM – Extração Assistida com Micro-ondas
EAP – Extração Assistida com Ultrapressão
EAU – Extração Assistida com Ultrassom
ECA – Enzima conversora de angiotensina
E_{max} – Efeito máximo
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
EPM – Erro padrão da média
FE – Fenilefrina
FIT – Departamento de Fitotecnia
FLOR – Herbário do Departamento de Botânica da UFSC
FMC – Departamento de Farmacologia
GBM – Glibenclamida
GCs – Guanilato ciclase solúvel
GMPc – Monofosfato de guanosina cíclica

GTP – Trifosfato de guanosina
HAS – Hipertensão arterial sistêmica
HOE-140 – Icatibanto
IbTX – Iberiotoxina
IC 95% – Intervalo de confiança no nível de significância de 95%
IMN – Indometacina
IMS – Institute for Healthcare Informatics
IP – Receptor para prostaciclina
 K_{ATP} – Canal para potássio sensível ao ATP
 K_V – Canal para potássio sensível a voltagem
L-Arg – L-arginina
LMBV – Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal
L-NAME – N_{ω} -nitro-L-arginina metil éster
LogCE₅₀ – Logaritmo da concentração efetiva mediana
MEP – Mepiramina
mTOR – Alvo mecânico para rapamicina
NO – Óxido nítrico
ODQ – 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3a] quinoxalina-1
OMS – Organização Mundial da Saúde
PA – Pressão arterial
PDE – Fosfodiesterase
PGI₂ – Prostaciclina
PI3K – Fostatidilinositol-3-cinase
PKG – Proteína cinase G
ROS – Espécies reativas de oxigênio
RP – Receptor para compostos fenólicos
Rp-PET – Rp-8-Br-PET-cGMPS
RVP – Resistência vascular periférica
SK_{Ca} – Canal para potássio de baixa condutância sensível ao cálcio
SOD – Superóxido dismutase
SRL – Sirolimo
SSD – Solução Salina Despolarizante
SSI – Solução Salina Isotônica
SUS – Sistema Único de Saúde
TEA – Tetraetilamônio
TPL – Tempol
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
WTMN – Wortmanina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 SOB(RE) PRESSÃO ARTERIAL.....	25
1.1.1 Pressão arterial: definição	25
1.1.2 Hipertensão arterial: definição e classificação	26
1.1.3 Impacto social da hipertensão arterial	27
1.1.4 Tratamento da hipertensão arterial	28
1.2 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE INVENÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS	30
1.3 MECANISMOS VASORRELAXANTES ENDOTELIAIS MEDIA- DOS PELOS POLIFENÓIS.....	32
1.4 JUÇARA (<i>Euterpe edulis</i> Mart.): UMA NOVA POSSIBILIDADE TERAPÊUTICA?.....	34
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 METODOLOGIA	39
3.1 INTEGRANTES DO PROJETO	39
3.2 MATERIAL BOTÂNICO.....	39
3.3 EXTRATOS AVALIADOS	40
3.4 ANIMAIS.....	41
3.5 FÁRMACOS.....	41
3.6 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS.....	42
3.7 ENSAIOS EM AORTA ISOLADA.....	42
3.7.1 Excisão, isolamento, montagem e estabilização em sistema de órgão isolado.....	42
3.7.2 Protocolo de investigação da reatividade vascular aos extratos de <i>Euterpe edulis</i> Mart.	45
3.7.3 Protocolo de avaliação da vasculotoxicidade do extrato de <i>Euterpe edulis</i> Mart.	46
3.7.4 Protocolo de investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante do extrato de <i>Euterpe edulis</i> Mart.....	46
3.7.4.1 Investigação do envolvimento da via da óxido nítrico sintase/ guanilato ciclase solúvel/proteína cinase G	47
3.7.4.2 Investigação do envolvimento da via da ciclooxigenase.....	47
3.7.4.3 Investigação do envolvimento de canais para potássio	47
3.7.4.4 Investigação do envolvimento de receptores para agonistas vasodilatadores endógenos clássicos	47
3.7.4.5 Investigação do envolvimento da via das serina/treonina cinases ..	48
3.7.4.6 Investigação do envolvimento de espécies reativas de oxigénio da sinalização redox.....	48

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4 RESULTADOS.....	51
4.1 REATIVIDADE VASCULAR	51
4.1.1 O efeito vasorrelaxante induzido pelos extratos de <i>Euterpe edulis</i> Mart. depende da concentração e do endotélio vascular	51
4.2 VASCULOTOXICIDADE E DESSENSIBILIZAÇÃO	53
4.3 MECANISMO DE AÇÃO VASORRELAXANTE.....	55
4.3.1 O relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 depende da ativação da via da óxido nítrico sintase/guanilato ciclase solúvel/proteína cinase G	55
4.3.2 A via da cicloxigenase não é determinante para o relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180.....	57
4.3.3 O bloqueio não seletivo de canais para potássio atenua o relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180.....	58
4.3.4 O bloqueio seletivo de canais para potássio não interfere no relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180.....	59
4.3.5 O antagonismo de receptores para acetilcolina, bradicinina ou histamina não interfere no relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180	61
4.3.6 O relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 depende da ativação dos efetores fosfatidilinositol-3-cinase e proteína cinase B	63
4.3.7 O relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 não depende do alvo mecanístico para rapamicina ou da proteína cinase ativada por AMP	64
4.3.8 O relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 é redox sensível ...	65
5 DISCUSSÃO.....	67
6 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 SOB(RE) PRESSÃO E HIPERTENSÃO ARTERIAL

1.1.1 Pressão arterial: definição

A pressão arterial (PA) é uma variável física obtida da aplicação dos princípios da mecânica dos fluidos para a compreensão da fisiologia dos movimentos circulatórios estudados pela hemodinâmica, podendo a PA ser calculada pela equação de Poiseuille através do produto do débito cardíaco (DC) pela resistência vascular periférica total (RVP), considerados os seus principais determinantes fisiológicos (Oigman, 1987; De Lolio, 1990). Devido à proporcionalidade existente entre DC e RVP, todos os fatores que alteram estas variáveis também podem alterar os níveis da PA.

$$PA = DC \times RVP$$

O débito cardíaco corresponde ao volume de sangue bombeado pelo ventrículo esquerdo do coração, por unidade de tempo, para as artérias, enquanto a resistência vascular periférica total consiste da dificuldade oferecida pelos vasos sanguíneos, determinada pelo calibre vascular, à circulação do sangue.

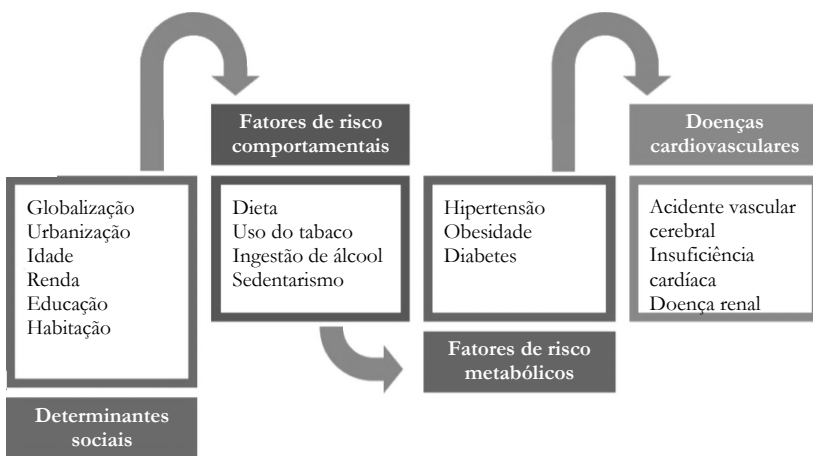
Mecanismos regulatórios locais, centrais e endócrinos adaptam a pressão às necessidades fisiológicas, tais como exercício físico ou resposta de luta e fuga, garantindo que os tecidos e órgãos sejam adequadamente perfundidos para suprir suas demandas metabólicas.

Conforme resume Oigman (1987), os objetivos fundamentais da regulação precisa da pressão são:

1. Fornecer uma pressão constante e suficientemente alta para que qualquer órgão tenha seu fluxo sanguíneo aumentado em caso de necessidade;
2. Que o aumento do fluxo para um órgão ou tecido em específico não comprometa o fluxo aos demais;
3. Que o nível da pressão seja adequado a fim de não comprometer, a longo prazo, o desempenho cardíaco ou provocar lesões nos vasos sanguíneos.

Falhas nos mecanismos regulatórios dos níveis pressóricos provocados por múltiplos fatores (Figura 1) levam ao surgimento de patologias, dentre elas a hipertensão arterial sistêmica (HAS), considerada o principal fator de risco para as doenças cardiovasculares (Chobanian et al., 2003).

Figura 1 – Principais fatores indutores para o desenvolvimento de hipertensão arterial e doenças associadas



Fonte: Adaptado da Organização Mundial da Saúde (2013).

1.1.2 Hipertensão arterial: definição e classificação

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Em março de 1978, uma comissão de especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS), reunida em Genebra, classificou a hipertensão arterial como sendo uma elevação crônica da pressão sistólica ou diastólica, adotando diretrizes baseadas na aferição de níveis pressóricos como critério de diagnóstico da hipertensão, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação da pressão arterial de acordo com a OMS

Categoria	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Normal	≤ 140	≤ 90
Limítrofe	141-159	91-94
Hipertensão	≥ 160	≥ 95

Fonte: Organização Mundial da Saúde (1978).

Entretanto, nos últimos 10 anos, muitos resultados conflitantes de estudos observacionais e ensaios clínicos controlados levaram a alteração das metas de pressão arterial até então estabelecidas (Tran e Giang, 2014).

Atualmente, no Brasil, uma nova classificação (Tabela 2) foi adotada pelas VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (DBH VI), publicada em 2010, refletindo com maior rigor o estado atual de conhecimento sobre pressão arterial.

Tabela 2 – Classificação da pressão arterial de acordo com a DBH VI

Categoria	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe	130-139	85-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010).

1.1.3 Impacto social da hipertensão arterial

Devido a sua alta prevalência e baixas taxas de controle, a HAS é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2010). A mortalidade por doenças cardiovasculares (DCV) aumenta progressivamente com a elevação da PA a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial, 2007) e é a principal causa de óbitos entre as doenças crônicas não transmissíveis, ocasionando 17 milhões de mortes por ano, o que corresponde a um terço do total de óbitos no mundo. A hipertensão é responsável por 9,4 milhões de mortes anuais no mundo. Projeções para 2030 apontam para um aumento da prevalência da mortalidade por doenças cardiovasculares se ações apropriadas de promoção da saúde não forem tomadas (Organização Mundial da Saúde, 2013).

No Brasil, as DCV lideram as causas de morte por mais de um século. Segundo dados compilados por Ribeiro et al. (2016), apenas em 2011, 384.615 mortes foram atribuídas a estas doenças, correspondendo a 31% do total de óbitos. As DCV também são responsáveis pela alta frequência de hospitalizações financiadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2012 foram registradas 940.023 atribuídas apenas as DCV, o que corresponde a 8,3% do total de hospitalizações e a um impacto financeiro de 18,6% do orçamento hospitalar repassado pelo SUS.

1.1.4 Tratamento da hipertensão arterial

O objetivo primordial do tratamento da hipertensão arterial é a redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares (Kannel, 1996; Padwal et al., 2001), devendo ser utilizadas inicialmente medidas não-medicamentosas relacionadas a mudança do estilo de vida como também medidas associadas a medicamentos anti-hipertensivos (Kohlmann Jr. et al., 1999).

Dentre as principais medidas não-medicamentosas destacam-se o controle de peso, adesão a padrões alimentares com baixos teores de gordura, redução do consumo de sal, moderação do consumo de álcool e prática de exercícios físicos. O impacto destas medidas na redução da pressão arterial é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Impacto de algumas modificações de estilo de vida na redução da pressão arterial

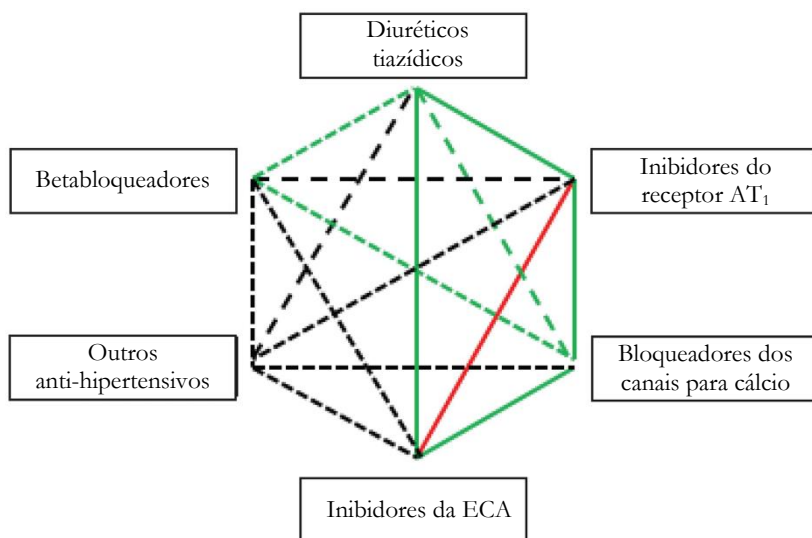
Modificação	Recomendação	Redução aprox. na PA
Controle de peso	Manter o peso corporal na faixa normal do IMC	5-20 mmHg para cada 10 Kg de peso reduzido
Padrão alimentar	Consumir dieta rica em frutas, vegetais e alimentos de baixa densidade calórica e baixo teor de gorduras	8-14 mmHg
Redução do consumo de sal	Reduzir a ingestão de sódio para não mais que 2 g	2-8 mmHg
Moderação no consumo de álcool	Limitar o consumo a 30 g/dia de etanol para os homens e 15 g/dia para as mulheres	2-4 mmHg
Exercício físico	Habilitar-se à prática regular de atividade física	4-9 mmHg

Fonte: VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2010).

Uma parcela de hipertensos não logra êxito no controle da pressão arterial apenas com medidas não-medicamentosas e necessitam ser tratados com algum medicamento anti-hipertensivo. Atualmente, o arsenal terapêutico comercialmente disponível para uso clínico no Brasil conta com um total de 57 fármacos anti-hipertensivos, dos quais 42 exercem efeitos diretos ou indiretos sobre os vasos sanguíneos. A escolha dos fármacos para o manejo clínico da hipertensão é baseada na eficácia da

redução da PA e nos desfechos cardiovasculares, podendo os mesmos serem administrados individualmente ou em combinação para o incremento da eficácia anti-hipertensiva (Póvoa et al., 2014). As principais classes de fármacos anti-hipertensivos e suas possíveis combinações estão resumidas na Figura 2 e foram validadas pelo Departamento de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia através da publicação do I Posicionamento Brasileiro sobre Combinação de Fármacos Anti-hipertensivos (Póvoa et al., 2014).

Figura 2 – Principais classes de anti-hipertensivos comercialmente disponíveis no Brasil e suas possíveis combinações



As linhas esquematizadas denotam as combinações de fármacos anti-hipertensivos preferenciais (verde contínua), aceitáveis (verde tracejada), menos usuais (preta tracejada) e não usuais (vermelha contínua), baseando-se em critérios de eficácia, tolerabilidade, maior possibilidade de adesão ao tratamento, evidências de proteção cardiovascular e renal e segurança do paciente. ECA = Enzima conversora de angiotensina e AT_1 = Receptor do subtipo AT_1 para angiotensina 2. Fonte: Adaptado de Gradman et al. (2010) e Mancia et al. (2013).

Embora exista um número considerável de fármacos para o tratamento da hipertensão, o controle da PA ainda é insatisfatório, contribuindo para a manutenção de altas taxas de morbidade e mortalidade das DCV no Brasil e no mundo (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão

Arterial, 2010). As razões para o desempenho aquém do esperado no controle da hipertensão são complexas, podendo estar relacionadas aos custos e dificuldades de acesso a serviços básicos de saúde, diagnóstico incorreto, não adesão dos usuários aos projetos terapêuticos existentes, limitações do tratamento farmacológico e eventos adversos, justificando a necessidade, em parte, para o desenvolvimento de novos fármacos e alternativas terapêuticas direcionadas a esta demanda não atendida (Coffman, 2011; Burnier et al., 2014; Oparil e Schmieder, 2015).

1.2 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE INVENÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS ANTI-HIPERTENSIVOS

O marco inicial da era dos descobrimentos de fármacos a partir de plantas se iniciou há mais de 200 anos, quando em 1805 o farmacêutico Friedrich Sertürner isolou e purificou o primeiro constituinte natural farmacologicamente ativo: a morfina, um analgésico obtido da *Papaver somniferum* L., popularmente conhecida como papoula (Li e Vederas, 2009). Desde então, atualmente estima-se que cerca de 80% de todos os fármacos já estabelecidos foram desenvolvidos a partir de produtos naturais (Gordaliza, 2009). O Quadro 1 mostra alguns fármacos, análogos ou derivados de constituintes naturais obtidos de plantas, com ação ou uso clínico no sistema cardiovascular.

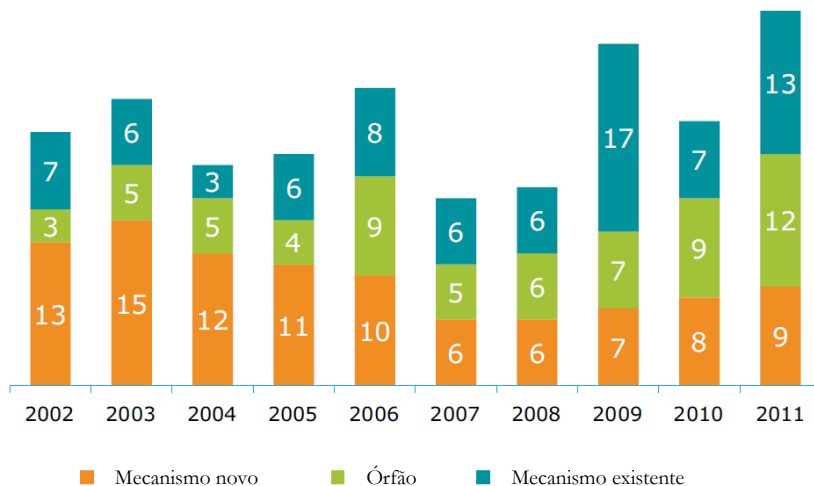
Quadro 1 – Alguns fármacos, análogos ou derivados de constituintes naturais obtidos de plantas, com ação ou uso clínico no sistema cardiovascular

Fármaco	Ação ou uso clínico	Planta
Digoxina	Cardiotônico	<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.
Reserpina	Anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth ex. Kurz
Metformina	Hipoglicemiante	<i>Galega officinalis</i> L.
Verapamil	Anti-hipertensivo	<i>Papaver somniferum</i> L.

Fonte: Adaptado de Fabricant e Farnsworth (2001).

Entre 2002-2011, uma média de 24 entidades moleculares novas foram lançadas por ano nos Estados Unidos, conforme ilustra e detalha a Figura 3. Apenas em 2011, foram lançadas 34 moléculas, o maior número dos últimos 10 anos, das quais 13 atuam por mecanismos farmacológicos já existentes.

Figura 3 – Entidades moleculares lançadas nos Estados Unidos entre os anos de 2002-2011



Entidades moleculares novas são definidas como sendo moléculas, entidades biológicas ou combinações onde pelo menos um elemento é novo, podendo as mesmas atuarem por mecanismos de ação novos, já existentes ou serem indicadas para tratamento de doenças raras, as quais não se conhece o mecanismo de ação exato (órfãos). Fonte: Adaptado de Institute for Healthcare Informatics (2012).

Dentre as entidades moleculares obtidas de plantas, há considerável interesse pelos polifenóis, uma vez que numerosos estudos experimentais e clínicos indicam que estes compostos devam proteger o sistema cardiovascular, melhorando a função endotelial e reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares (Schini-Kerth et al., 2010).

Estes estudos demonstram que extratos ricos em polifenóis obtidos de matrizes biológicas diversas são capazes de induzir relaxamento dependente de concentração em anéis isolados de aorta de rato com endotélio por mecanismos diversos, promovendo regulação do tônus vascular e controle da pressão arterial (Fitzpatrick et al., 1993; Dharmashankar e Widlansky, 2010). Também há evidências de que a ingestão crônica de polifenóis induz efeito benéfico em outros modelos experimentais de doenças cardiovasculares, como os de hipertensão, diabetes e aterosclerose (Schini-Kerth et al., 2011).

1.3 MECANISMOS VASORRELAXANTES ENDOTELIAIS MEDIADOS PELOS POLIFENÓIS

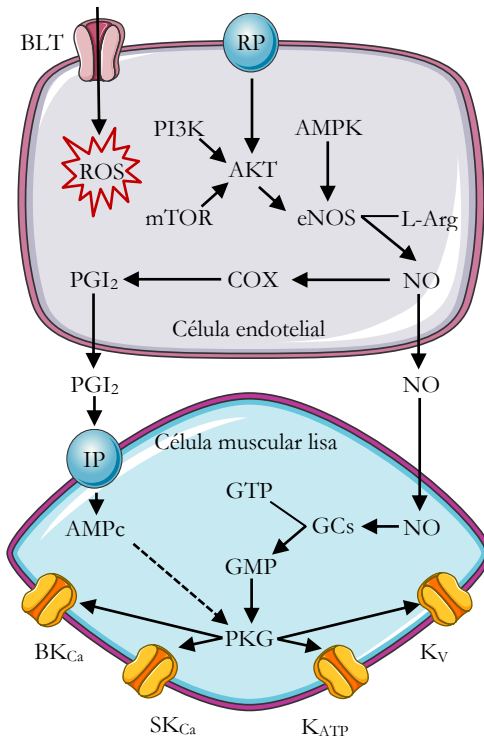
Os mecanismos gerais pelos quais os compostos fenólicos atuam nas células endoteliais e musculares lisas estão representados na Figura 4.

Os principais alvos membranares plasmáticos das células endoteliais para compostos fenólicos são o transportador bilitranslocase (BLT) (Maestro et al., 2010) e receptores para compostos fenólicos (RP) (Fujimura et al., 2012; Kim et al., 2014). O transportador BLT transporta os polifenóis do meio extracelular para o meio intracelular. Ao estarem presentes no citoplasma das células endoteliais, processos mediados por receptores inespecíficos e autooxidação levam os compostos fenólicos a produzirem espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido (não representados no esquema) (Mochizuki et al., 2002; Elbling et al., 2005; Kim et al., 2007), alterando o estado redox celular e ativando a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), uma cinase redox sensível. Ao ser ativada, a PI3K fosforila uma série de proteínas com domínios de ancoragem para a ligação a fosfolipídeos, sendo as mesmas responsáveis pela fosforilação e posterior ativação da proteína cinase B (AKT). A AKT fosforila a eNOS no resíduo Ser 1177, ativando-a (Dimmeler et al., 1999). A AKT também poderá ser fosforilada e ativada por outros efetores, como o alvo mecanístico para rapamicina (mTOR) (Sarbasov et al., 2005) ou então a AKT poderá ser diretamente ativada por receptores de membrana para compostos fenólicos (RP), num processo redox independente. Quando ativa, eNOS catalisa a reação de biotransformação da L-arginina em L-citrulina e óxido nítrico (NO) (Palmer et al., 1988). O óxido nítrico produzido poderá ativar enzimas endoteliais, como as cicloxigenases (COX) e induzir a formação de prostaciclina (PGI₂) (Moncada et al., 1977; Hyslop e De Nucci, 1991; Salvemini et al., 1993), bem como o NO poderá se difundir, permeando as membranas celulares e atingindo as células musculares lisas (Ignarro, 1990).

Nas células musculares lisas, o NO se liga ao seu alvo constitutivo, a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) (Ignarro, 1991). Quando ativa, esta enzima catalisa a reação de biotransformação do GTP em GMPc (Waldman e Murad, 1987). As fosfodiesterases (PDE) inativam o GMPc por hidrólise, tendo sido demonstrado que alguns compostos fenólicos inibem esta reação catalítica, prolongando a biodisponibilidade do GMPc (Ruckstuhl et al., 1979). A prostaciclina, ao se ligar a receptores IP, ativa a enzima adenilato ciclase, responsável por catalisar a biotransformação do ATP em AMPc (Tateson et al., 1977). O GMPc, definido como o segundo mensageiro a jusante do NO, ativa a proteína cinase G (PKG) e o AMPc

poderá ativar indiretamente esta cinase promovendo um efeito sinérgico (Salvemini et al., 1993). A PKG, quando ativa, apresenta como um dos seus alvos relevantes os canais para potássio (K⁺), ativando-os e induzindo vasorrelaxamento por efluxo de K⁺ e hiperpolarização (Archer et al., 1994).

Figura 4 – Mecanismos gerais de ação mediados pelos polifenóis



BLT: bilitranslocase; RP: receptor para polifenóis; ROS: espécies reativas de oxigênio; PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase; mTOR: alvo mecanístico para rapamicina; AKT: proteína cinase B; AMPK: proteína cinase ativada por AMP; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; L-Arg: L-arginina; NO: óxido nítrico; COX: cicloxigenase; PGI₂: prostaciclina; IP: receptor para prostaciclina; AMPc: monofosfato de adenosina cíclica; GCs: guanilato ciclase solúvel; GTP: trifosfato de guanosina; GMP: monofosfato de guanosina cíclica; PKG: proteína cinase G; PDE: fosfodiesterase; BK_{Ca}: canal para potássio de alta condutância sensível ao cálcio; SK_{Ca}: canal para potássio de baixa condutância sensível ao cálcio; K_V: canal para potássio sensível a voltagem e K_{ATP}: canal para potássio sensível ao ATP.
 Fonte: Adaptado de Servier Medical Art.

1.4 JUÇARA (*Euterpe edulis* Mart.): UMA NOVA POSSIBILIDADE TERAPÊUTICA?

A juçara ou açai de juçara (Figura 5), cientificamente conhecida como *Euterpe edulis* Mart. é uma palmeira monocaule, nativa da mata atlântica, bastante explorada economicamente para a produção comercial do palmito, o que tem levado ao gradativo esgotamento da espécie, hoje ameaçada de extinção. A palavra ‘juçara’ deriva do tupi, e significa ‘o que dá farpas’, terminologia relacionada à formação do tronco da planta. Devido a extração do palmito ser acompanhada do abate da planta, uma das estratégias adotadas para a preservação da espécie se insere dentro do contexto do aproveitamento de recursos florestais não madeireiros, tendo sido criados diversos programas de incentivo a exploração dos seus frutos em substituição a exploração do palmito.

Diversos trabalhos demonstram ser as antocianinas os principais compostos fenólicos com atividade biológica presentes nos frutos de *Euterpe edulis* Mart. (Borges et al., 2011; Inacio et al., 2013; Bicudo et al., 2014). Estudos em modelos animais demonstram efeito benéfico dos extratos obtidos de seus frutos. Em estudo conduzido por Constancio (2015) em camundongos Swiss, submetidos durante 14 semanas a dieta hipercalórica, hiperlipídica e hiperglicídica, também denominada de dieta de cafeteria, os extratos de *Euterpe edulis* Mart., ao serem adicionados à dieta, levaram a uma atenuação de hipertrofia de adipócitos, avaliada por técnicas histológicas, sendo este efeito associado a ocorrência de lipólise e decréscimo no acúmulo de triacilgliceróis, reduzindo, portanto, o risco de dano associado ao aumento de adiposidade promovido pela dieta de cafeteria.

Rocha et al. (2007), ao estudar extratos da planta *Euterpe oleracea* Mart., nativa da floresta amazônica, observou que os mesmos foram capazes de induzir vasorrelaxamento dependente do endotélio vascular, observado em leito mesentérico obtido de ratos Wistar, sugerindo o uso da planta para o tratamento de doenças cardiovasculares.

Também foi observado em estudo pioneiro realizado por Cardoso et al. (2015) que o consumo agudo de suco de juçara em humanos reduziu a peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis, avaliada por ensaios enzimáticos realizados após coleta de sangue dos indivíduos participantes do estudo.

Como não há descrito na literatura estudos relacionados aos efeitos vasculares e mecanismos associados para a planta *Euterpe edulis* Mart. e devido ao seu potencial para a manutenção do equilíbrio do ecossistema e para a geração de produtos inovadores e de interesse a

indústria farmacêutica, extratos desta planta foram avaliados quanto ao seu efeito sobre o tônus vascular e mecanismos de ação relacionados.

Figura 5 – Juçara (*Euterpe edulis* Mart.)



Fonte: Imagem gentilmente cedida por Diana Carneiro. Arquivo pessoal (2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito e mecanismos vasorrelaxantes induzido por extratos obtidos dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. em aorta de ratos Wistar por metodologia in vitro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar o efeito induzido pelos extratos de *Euterpe edulis* Mart. obtidos por diferentes técnicas de extração e selecionar o melhor extrato, baseando-se em critérios farmacológicos de potência e eficácia e critérios relacionados a eficiência de extração das técnicas empregadas;
- ii. Avaliar a participação do endotélio vascular no efeito induzido pelo extrato selecionado;
- iii. Avaliar a participação da via da óxido nítrico sintase/guanilato ciclase solúvel/proteína cinase G no efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato;
- iv. Avaliar a participação da via da cicloxigenase no efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato;
- v. Avaliar a participação dos canais para potássio no efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato;
- vi. Avaliar a participação de receptores para agonistas vasodilatadores endógenos clássicos no efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato;
- vii. Avaliar a participação da via das serina/treonina cinases no efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato;
- viii. Avaliar a participação de espécies reativas de oxigênio da sinalização redox no efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato.

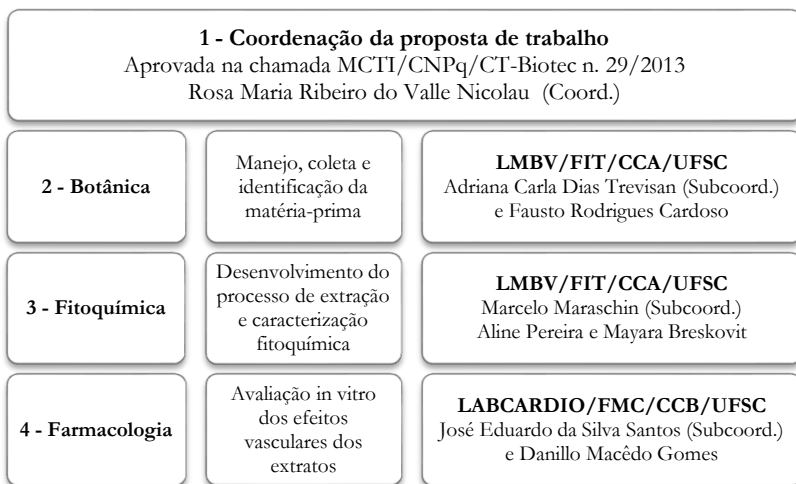
3 METODOLOGIA

3.1 INTEGRANTES DO PROJETO

Para a consecução dos objetivos propostos neste trabalho é importante destacar as parcerias realizadas entre o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) e o Laboratório de Farmacologia Cardiovascular (LABCARDIO) da Universidade Federal de Santa Catarina.

As áreas trabalhadas, metas principais desenvolvidas e equipes integrantes do projeto de pesquisa da planta *Enterpe edulis* Mart. seguem esquematizadas na Figura 6.

Figura 6 – Áreas e atividades desenvolvidas pela equipe da proposta de trabalho



Fonte: Autor, 2016.

3.2 MATERIAL BOTÂNICO

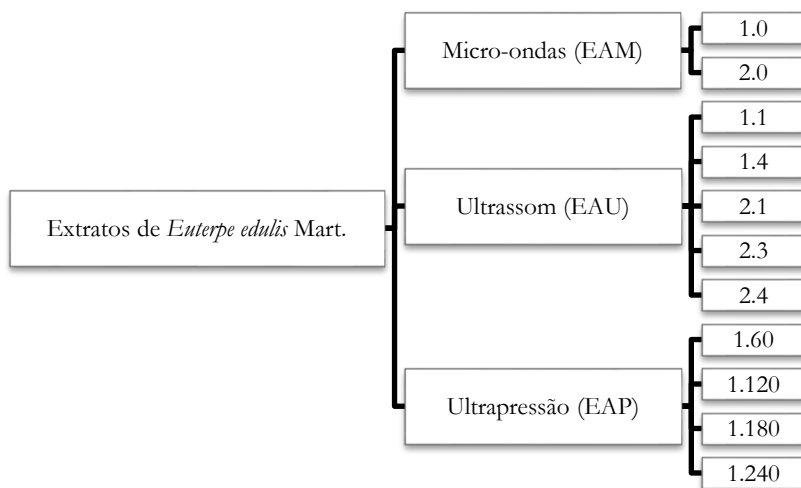
Os frutos de *Enterpe edulis* Mart. foram fornecidos por produtores do município de Paulo Lopes, Santa Catarina. A identificação botânica foi realizada através de comparação com exemplares da planta depositados no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa

Catarina (FLOR)¹ e as matérias-primas obtidas dos frutos foram armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o início do processo extrativo.

3.3 EXTRATOS AVALIADOS

Foram avaliados os efeitos vasculares de onze extratos de *Euterpe edulis* Mart., obtidos por técnicas de Extração Assistida com Micro-ondas (EAM), Extração Assistida com Ultrassom (EAU) e Extração Assistida com Ultrapressão (EAP), esquematizados na Figura 7.

Figura 7 – Extratos de *Euterpe edulis* Mart. avaliados



O sistema de nomeação dos extratos obtidos adotou um código literal e numeral. O código literal, 'EAM, EAU ou EAP', designa a técnica de extração assistida às quais os extratos foram submetidos (EA = Extração Assistida, M = Micro-ondas, U = Ultrassom e P = Ultrapressão). O código numeral, composto por dois números separados por um ponto, indicam o solvente e tempo de extração da técnica correspondente. O primeiro número, a esquerda do ponto, identifica o solvente extrator utilizado na técnica, podendo ser 1 ou 2 (1 = EtOH 50% ou 2 = H₂O). O segundo número, a direita do ponto, designa o tempo de extração, com '0' indicando um tempo de extração cíclico e valores acima de zero indicando um tempo de extração linear, expresso em minutos. Fonte: Autor, 2016.

¹Os exemplares depositados encontram-se registrados sob os códigos FLOR0018143, FLOR0027425, FLOR0041679, FLOR0041682 e disponíveis para consulta na rede *speciesLink* (<http://www.splink.org.br>).

A eficiência das metodologias de extração foi determinada por métodos instrumentais, conforme procedimentos apresentados no Anexo A e todos os extratos foram caracterizados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais e rendimento de extração, conforme apresentado na Tabela 1 do mesmo anexo. Detalhes gerais sobre as técnicas de extração podem ser consultados em Khoddami et al. (2013).

Os extratos avaliados foram mantidos sob refrigeração, a -26 °C e nos dias de realização dos experimentos foram diluídos em água destilada para se obter uma solução a 10 mg/mL.

3.4 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com 3 a 4 meses de idade, todos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os animais foram acondicionados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, mantidos em grupos de, no máximo, 5 ratos por caixa de polipropileno, forradas com maravalha, em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo de iluminação claro/escuro (12/12 h) e livre acesso à ração e água.

Os protocolos para uso de animais na experimentação empregada neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o código 5371190815 e todos os procedimentos de cuidado e manejo seguiram as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.5 FÁRMACOS¹

Os fármacos utilizados neste estudo foram: Acetilcolina (ACh), 1,3- Diidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo [4,5-g] quinoxalina-7) fenil) metil)-4-piperidina)-2H-benzimidazolona-2 (AKTi-1/2), Acetovanilona (AV), Apamina (APA), Atropina (ATR), Carboxi-PTIO (c-PTIO), Composto C (CpC), Fampridina (4-AP), Fenilefrina (FE), Glibenclamida (GBM), Iberiotoxina (IbTX), Icatibanto (HOE-140), Indometacina (IMN), Mepiramina (MEP), N_ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), 1H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3a] quinoxalina-1 (ODQ), Rp-8-Br-PET-cGMPS (Rp-PET), Sirolimo (SRL), Superóxido dismutase (SOD), Tempol (TPL),

¹Os nomes dos fármacos que aparecem nesta dissertação obedecem, preferencialmente, aos critérios dispostos na Resolução RDC n. 63, de 28/12/2012, da ANVISA.

Tetraetilamônio (TEA) e Wortmanina (WTMN), adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos).

As soluções estoque para ACh, ATR, AV, c-PTIO, HOE-140, IbTX, IMN, L-NAME, MEP, Rp-PET, SOD, TEA e TPL foram preparadas em água destilada; para AKTi-1/2, 4-AP, CpC, GBM, ODQ, SRL e WTMN em DMSO; e para APA em HCl 0,1 N. Todas as soluções (estoque e de trabalho) dos fármacos foram mantidas sob refrigeração (-26 °C).

3.6 SOLUÇÕES FISIOLÓGICAS

As soluções fisiológicas utilizadas neste estudo foram: Solução Salina Isotônica (SSI), composta por (em mM): NaCl 131,3, KCl 4,7, KH_2PO_4 1,18, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,17, NaHCO_3 14,9, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 5,5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6 e EDTA¹ 0,03 e Solução Salina Despolarizante (SSD), com alta concentração de cloreto de potássio, composta por (em mM): NaCl 14,37, KCl 120, KH_2PO_4 1,18, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,17, NaHCO_3 14,9, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 5,5 e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6.

Todos os sais empregados no preparo das soluções SSI e SSD foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Estados Unidos) e dissolvidos individualmente em água destilada, sob agitação, utilizando-se em torno de 70% do volume final da solução a ser preparada. As soluções foram mantidas sob refrigeração (0-4 °C) e usadas para experimentação em até três dias.

3.7 ENSAIOS EM AORTA ISOLADA

3.7.1 Excisão, isolamento, montagem e estabilização em sistema de órgão isolado²

Os ratos foram anestesiados através de uma injeção intraperitoneal da associação de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg), adquiridos da Syntec (Santana do Parnaíba, Brasil). A profundidade da anestesia foi verificada pela imobilidade física e ausência dos reflexos podal e caudal. Constatada a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para dissecação da camada de pele da região torácica e abdominal até a

¹Embora não presente em condições fisiológicas, EDTA foi utilizado para quelar quantidades traço de íons de metais pesados presentes na SSI (Schubert, 2005).

²O protocolo para excisão, isolamento, montagem e estabilização das preparações em sistema de órgão isolado seguiu recomendações metodológicas descritas por Nicosia e Zhu (2004), Angus e Wright (2000), Kenakin (2001), Ko et al. (2010) e Yildiz et al. (2013).

exposição da camada muscular subjacente, sendo realizada uma tóraco-laparotomia para visualização dos órgãos internos.

Os intestinos, estômago, baço e fígado foram deslocados e o diafragma seccionado na direção ventral/dorsal. A aorta, visualizada ao longo da coluna vertebral, foi dissecada em seu segmento torácico descendente, situado a partir da extremidade posterior, acima do diafragma, até a anterior, logo abaixo do arco aórtico e transferida para uma placa de Petri contendo SSI (composição descrita em 3.6) fria ($\sim 4^{\circ}\text{C}$). O tecido adiposo perivascular e coágulos de sangue foram removidos e a aorta foi seccionada em anéis de, aproximadamente, 3-5 mm.

Para montagem e estabilização em sistema de órgão isolado, os anéis foram inseridos entre duas hastes rígidas em formato de L, feitas em aço inoxidável e calibre apropriado para o diâmetro do vaso. Uma das hastes foi fixada em material plástico (metacrílico), enquanto a outra foi diretamente conectada a um transdutor de força modelo TRI 210 (Letica, Barcelona, Espanha) acoplado a um sistema digital PowerLab (ADInstruments, Bella Vista, Austrália) para aquisição dos dados. Cada anel foi mantido sob condições funcionais em cuba de vidro para órgão isolado (Figura 8) contendo 3 mL de SSI aquecida a 37°C e constantemente aerada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2).

O conjunto de procedimentos para excisão, isolamento e montagem da aorta de cada animal foi executado tão rápido quanto possível, em no máximo 30 min.

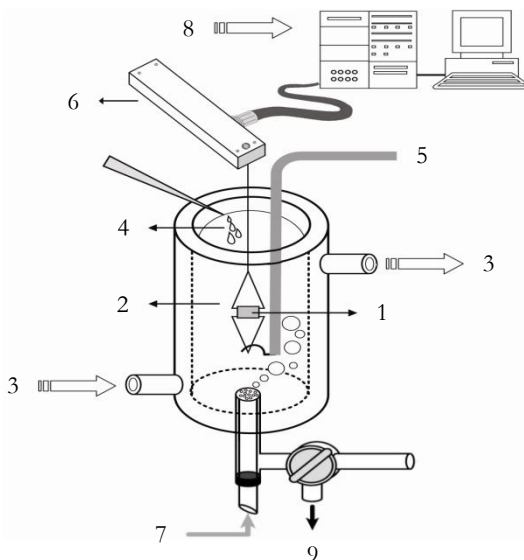
O registro das contrações e relaxamentos isométricos foi realizado em programa LabChart versão 8.0 para Windows (ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e as respostas para os agentes vasoativos foram expressas em g. A tensão de repouso (basal) dos anéis foi mantida em 3 g, a qual foi determinada em experimentos preliminares¹, e constantemente ajustada em intervalos de 15 min, seguidos de lavagens² com SSI. Foi esperado um tempo de 60 min para estabilização passiva da tensão.

Após o período de estabilização, foi avaliada a viabilidade dos anéis ao adicionar-se SSD (composição descrita em 3.6) nas cubas, seguida de um intervalo de estabilização de 30 min e lavagens a cada 15 min. Posteriormente, a função endotelial foi avaliada por adição de acetilcolina ($1\text{ }\mu\text{M}$), um agonista de receptores muscarínicos endoteliais em anéis pré-contráídos com fenilefrina ($1\text{ }\mu\text{M}$), um agonista de receptores adrenérgicos.

¹Para determinação da tensão de repouso, anéis de aorta foram estabilizados com três diferentes tensões (1, 2 e 3 g) e em seguida contraídos com fenilefrina ($1\text{ }\mu\text{M}$). A tensão que proporcionou maior resposta contrátil foi considerada ideal, neste caso, 3 g (dados não mostrados).

²Em todos os protocolos experimentais deste trabalho, os procedimentos de lavagem dos anéis de aorta foram realizados com SSI.

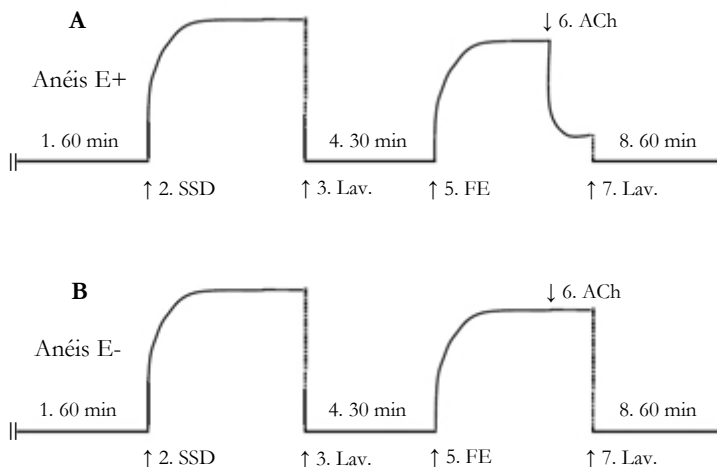
Figura 8 – Representação esquemática de uma cuba para sistema de órgão isolado



Nesta figura é representada uma cuba para órgão isolado contendo um anel de aorta (1) imerso em solução salina isotônica (2). A cuba possui dois compartimentos, um externo, com dois ductos laterais (3) que devem ser conectados a uma bomba de fluxo para circulação contínua de água aquecida a 37 °C, e um interno, onde os anéis de aorta (1) são suspensos em duas hastas metálicas e imersos em solução salina isotônica (2), constantemente aerada com mistura carbogênica (7). Uma das hastas é fixada a um suporte plástico (5), enquanto a outra é conectada a um transdutor de força (6), acoplado a um micrômetro para ajuste de tensão (não representado no esquema) e a um sistema digital (8) para detecção, aquisição e leitura das variações de tensão isométrica ao expor os anéis de aorta a substâncias vasoativas (4). Para procedimento de troca de solução salina isotônica (e.g. lavagem dos anéis), esta é drenada por um ducto de descarte (9). Fonte: Adaptado de Yildiz et al. (2013) e Jespersen et al. (2015).

Foram considerados anéis com endotélio funcional (E+) aqueles cujo relaxamento induzido pela acetilcolina foi igual ou superior a 80% da contração induzida pela fenilefrina; e anéis sem endotélio funcional (E-) aqueles com ausência de resposta vasorrelaxante frente a acetilcolina, avaliada após fricção mecânica do lúmen dos anéis com haste metálica. Anéis E+ e E- foram estabilizados durante 60 min e lavados em intervalos de 15 min, conforme esquematizado na Figura 9.

Figura 9 – Esquema representativo do protocolo de avaliação de viabilidade e estabilização dos anéis de aorta, comum a todos os experimentos



Anéis E+ e E- foram estabilizados durante 60 min (1). A viabilidade dos anéis foi avaliada por adição de SSD (2). As preparações foram lavadas (3) e estabilizadas durante 30 min (4), com trocas de SSI a cada 15 min. Em seguida, foram contraídas com FE (1 μ M) e relaxadas com ACh (1 μ M) para avaliação da função endotelial (5-6). As preparações E+ e E- foram lavadas e estabilizadas durante 60 min, com trocas de SSI a cada 15 min (7-8). Fonte: Autor, 2016.

3.7.2 Protocolo de investigação da reatividade vascular aos extratos de *Enterpe edulis* Mart.

O efeito vasorrelaxante dos extratos foi avaliado em anéis de aorta com endotélio funcional a partir da obtenção de Curvas Concentração-Efeito (CCE), realizadas após execução das etapas anteriormente descritas na seção 3.7.1. Os extratos foram adicionados nas cubas contendo anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (1 μ M), em concentrações cumulativas e crescentes de 10, 30, 50 e 100 μ g/mL, calculadas em relação aos rendimentos de extração das técnicas empregadas.

As variações de tensão em anéis de aorta proporcionadas pela adição dos extratos foram expressas como alterações percentuais no tônus a partir do platô de contração induzido pela fenilefrina. Foi calculado o Efeito Máximo (E_{max}) e o Logaritmo da Concentração Efetiva Mediana ($LogCE_{50}$) para cada extrato, tendo sido selecionado os mais eficazes e

potentes. Extratos equipotentes e equieficazes foram comparados quanto a capacidade extrativa das técnicas empregadas, avaliada indiretamente pela determinação do teor de compostos fenólicos totais, sendo selecionado o extrato com maior teor para o desenvolvimento das demais etapas deste estudo. Foi realizada uma CCE em anéis sem endotélio para o extrato selecionado, nas mesmas concentrações anteriormente descritas, tendo sido avaliado o envolvimento endotelial no efeito vasorrelaxante.

3.7.3 Protocolo de avaliação da vasculotoxicidade do extrato de *Euterpe edulis* Mart.

Para avaliar o efeito residual do extrato selecionado sobre a reversibilidade das funções contraturante e relaxante, anéis de aorta com endotélio funcional, viáveis e estabilizados conforme descrito em 3.7.1, foram incubados durante 30 min com a concentração de 100 µg/mL do extrato. Anéis utilizados como controle não foram expostos ao extrato durante esse período. Decorrido o tempo de incubação, os anéis (controle e expostos ao extrato) foram lavados e estabilizados durante 60 min, com trocas de SSI a cada 15 min. Ao final, foram contraídos com fenilefrina (1 µM) e relaxados com acetilcolina (1 µM) para avaliação qualitativa da função endotelial, tendo sido a manutenção ou alteração deste parâmetro, em comparação ao controle, utilizado para avaliação preditiva da vasculotoxicidade.

Em um segundo protocolo, anéis com endotélio funcional, pré-contraídos com fenilefrina (1 µM), foram expostos a concentrações cumulativas e crescentes para o extrato até 100 µg/mL. Anéis utilizados como controle foram apenas contraídos com fenilefrina (1 µM). Em seguida, os anéis (controle e expostos ao extrato) foram lavados e estabilizados durante 60 min, com trocas de SSI a cada 15 min. Ao final, foram novamente contraídos com fenilefrina (1 µM) e desta vez ambos foram expostos a uma CCE para o extrato até 100 µg/mL. Foi possível avaliar a manutenção ou alteração da sensibilidade e efeito do extrato por comparação do LogCE_{50} e E_{max} em anéis unicamente e repetidamente expostos a CCE.

3.7.4 Protocolo de investigação do mecanismo de ação vasorrelaxante do extrato de *Euterpe edulis* Mart.

Foram incubados durante 30 min, em anéis de aorta com endotélio funcional, viáveis e estabilizados conforme descrito em 3.7.1, SSI contendo fármacos para investigação do envolvimento de múltiplas vias de transdução de sinal no mecanismo de ação vasorrelaxante induzido pelo

extrato selecionado de *Euterpe edulis* Mart. As descrições gerais das atividades biológicas dos fármacos utilizados neste protocolo encontram-se descritas a seguir e a seleção das concentrações dos fármacos foi baseada em estudos preliminares do laboratório.

3.7.4.1 Investigação do envolvimento da via da óxido nítrico sintase/guanilato ciclase solúvel/proteína cinase G

Para avaliar se a inibição da via da óxido nítrico sintase/guanilato ciclase solúvel/proteína cinase G interfere no mecanismo vasorrelaxante induzido pelo extrato selecionado, anéis de aorta foram incubados com os fármacos c-PTIO (300 μ M), scavenger do óxido nítrico; L-NAME (100 μ M), inibidor competitivo reversível não seletivo da óxido nítrico sintase; ODQ (10 μ M), inibidor competitivo reversível seletivo da guanilato ciclase solúvel ou Rp-PET (100 μ M), inibidor competitivo reversível seletivo da proteína cinase G.

3.7.4.2 Investigação do envolvimento da via da cicloxigenase

Para avaliar se o efeito do extrato selecionado depende da produção de metabólitos vasorrelaxantes derivados do ácido araquidônico, anéis de aorta foram incubados com o fármaco IMN (10 μ M), inibidor competitivo reversível não seletivo da cicloxigenase.

3.7.4.3 Investigação do envolvimento de canais para potássio

Para avaliar se o efeito vasorrelaxante do extrato selecionado depende de mecanismos hiperpolarizantes, anéis de aorta foram incubados com os fármacos APA (0,1 μ M), bloqueador seletivo de canais para K^+ de baixa condutância sensíveis ao Ca^{2+} ; 4-AP (1 mM), bloqueador seletivo de canais para K^+ sensíveis a voltagem; GBM (10 μ M), bloqueador seletivo de canais para K^+ sensíveis ao ATP; IbTX (100 nM), bloqueador seletivo de canais para K^+ de alta condutância sensíveis ao Ca^{2+} ou TEA (10 mM e 1 mM), bloqueador não seletivo de canais para K^+ e bloqueador seletivo de canais para K^+ de alta condutância sensíveis ao Ca^{2+} , respectivamente.

3.7.4.4 Investigação do envolvimento de receptores para agonistas vasodilatadores endógenos clássicos

Para avaliar se os compostos bioativos do extrato selecionado induzem efeito vasorrelaxante dependente do endotélio por mimetizarem a ação de agonistas vasodilatadores endógenos clássicos, anéis de aorta

foram incubados com os fármacos ATR (1 μM), antagonista competitivo reversível não seletivo de receptores para acetilcolina; HOE-140 (1 μM), antagonista competitivo reversível seletivo de receptores para bradicinina do subtipo B₂ ou MEP (10 μM), antagonista competitivo reversível seletivo de receptores para histamina do subtipo H₁.

3.7.4.5 Investigação do envolvimento da via das serina/treonina cinases

Para avaliar se os compostos bioativos do extrato selecionado induzem efeito vasorrelaxante dependente de proteínas serina/treonina cinases específicas, anéis de aorta foram incubados com os fármacos AKTi-1/2 (100 μM), inibidor alostérico reversível seletivo da proteína cinase B; CpC (2 μM), inibidor competitivo reversível não seletivo da proteína cinase ativada por AMP; SRL (20 μM), inibidor alostérico irreversível seletivo do alvo mecanístico para rapamicina ou WTMN (0,5 μM), inibidor não competitivo irreversível seletivo da fosfatidilinositol-3-cinase.

3.7.4.6 Investigação do envolvimento de espécies reativas de oxigênio da sinalização redox

Para avaliar se alterações no estado redox interferem no mecanismo vasorrelaxante induzido pelo extrato selecionado, anéis de aorta foram incubados com os fármacos AV (100 μM), antagonista de espécies reativas de oxigênio produzidas a partir do peróxido de hidrogênio; SOD (150 U/mL), catalisador da dismutação de radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio ou TPL (300 μM), mimético da SOD.

Cubas com anéis de aorta para controle não foram tratadas com os fármacos supracitados durante o período de incubação. Em seguida, todos os anéis foram novamente contraídos com fenilefrina (1 μM) e expostos a uma CCE para o extrato até 100 $\mu\text{g/mL}$. O efeito induzido pelo extrato em anéis controle e tratado foi comparado através do cálculo do LogCE₅₀ e E_{max}, tendo sido a manutenção ou alteração significativa destes parâmetros utilizados para delinear o(s) mecanismo(s) envolvido(s) na resposta vasorrelaxante.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Comparações entre grupos foram realizadas por Análise de Variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados para denotar diferenças significativas. Todos os cálculos foram realizados no programa GraphPad Prism versão 6.05 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Estados Unidos).

4 RESULTADOS

4.1 REATIVIDADE VASCULAR

4.1.1 O efeito vasorrelaxante induzido pelos extratos de *Euterpe edulis* Mart. depende da concentração e do endotélio vascular

Concentrações cumulativas e crescentes (10, 30, 50 e 100 µg/mL) de oito dos onze extratos obtidos das técnicas assistidas com micro-ondas, ultrassom ou ultrapressão induziram vasorrelaxamento gradual em anéis de aorta torácica de rato providos de endotélio funcional (Figuras 10A-C).

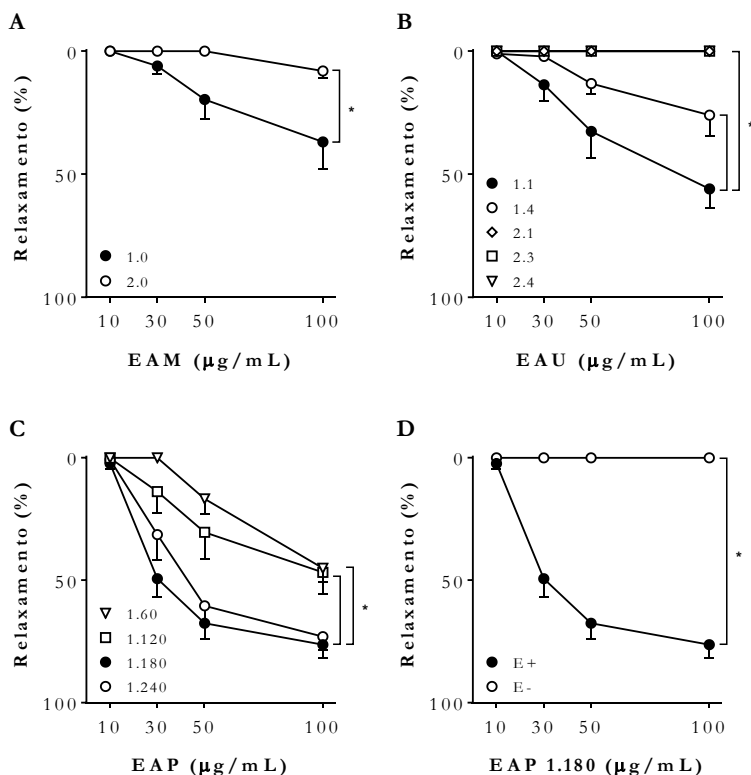
O extrato hidroalcoólico de *Euterpe edulis* Mart. obtido da técnica de extração assistida com ultrapressão durante 180 min (EAP 1.180) apresentou maior valor médio para E_{\max} ($76,3 \pm 5,4\%$). Não houve diferença significativa do efeito máximo e da concentração efetiva mediana apresentados pelos extratos EAP 1.180, EAP 1.240 e EAU 1.1 conforme Tabela 4. No entanto, EAP 1.180 foi considerado o extrato mais otimizado, tendo apresentado maior concentração de compostos fenólicos totais, conforme disposto na Tabela 1 do Anexo A.

Tabela 4 – Logaritmo da concentração efetiva mediana (LogCE_{50}) e efeito máximo (E_{\max}) para extratos de *Euterpe edulis* Mart. obtidos por diferentes metodologias

Técnica de extração	Extrato	LogCE_{50} (µg/mL)	E_{\max} (%)
Micro-ondas (EAM)	1.0	$1,7 \pm 0,2$	$36,9 \pm 11,1$
	2.0	$2,0 \pm 0,1$	$8,0 \pm 2,7$
Ultrassom (EAU)	1.1	$1,7 \pm 0,2$	$56,0 \pm 7,6$
	1.4	$1,7 \pm 0,1$	$26,0 \pm 8,6$
	2.1	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
	2.3	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
	2.4	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
Ultrapressão (EAP)	1.60	$1,7 \pm 0,4$	$45,0 \pm 5,6$
	1.120	$1,6 \pm 0,2$	$46,7 \pm 8,8$
	1.180	$1,4 \pm 0,2$	$76,3 \pm 5,4$
	1.240	$1,5 \pm 0,1$	$73,0 \pm 5,4$

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média para LogCE_{50} e E_{\max} ($n = 5-8$).

Figura 10 – Relações concentração-efeito para os extratos de *Enterpe edulis* Mart. obtidos por diferentes metodologias de extração



Curvas concentração-efeito para os extratos de *Enterpe edulis* Mart. obtidos das técnicas assistidas com micro-ondas (EAM, A), ultrassom (EAU, B) ou ultrapressão (EAP, C), quando adicionados cumulativamente em anéis de aorta de rato pré-contráidos com fenilefrina ($1\ \mu\text{M}$). Os efeitos do EAP 1.180 foram avaliados em preparações com (E+) e sem (E-) endotélio funcional (D). Os dados foram plotados em escala linear e representam a média \pm erro padrão da média ($n = 4-8$). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina ($1\ \mu\text{M}$). Comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

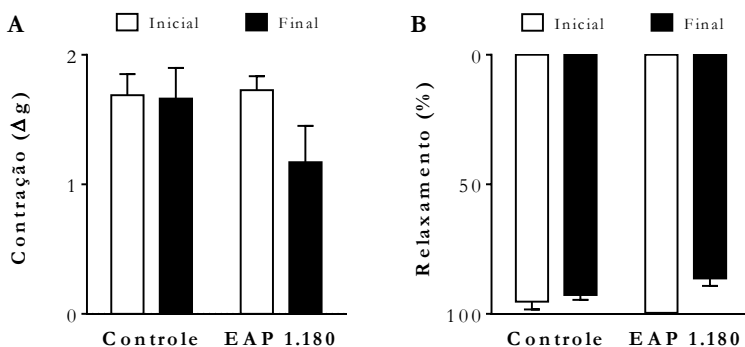
EAP 1.180 induziu relaxamento dependente de concentração apenas em anéis de aorta torácica de rato providos de endotélio funcional

(Figura 10D). Em anéis desprovidos de endotélio funcional, o efeito vasorrelaxante induzido por EAP 1.180 foi completamente abolido para todas as concentrações avaliadas da CCE.

4.2 VASCULOTOXICIDADE E DESSENSIBILIZAÇÃO

O extrato EAP 1.180 não induziu mudanças significativas na integridade funcional do musculo liso e endotélio vascular, avaliados uma hora após incubação de anéis de aorta torácica ao extrato por 30 min, através do cálculo da variação de contração, expresso em g, para a fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) e relaxamento percentual para acetilcolina ($1 \mu\text{M}$) (Figuras 11A-B).

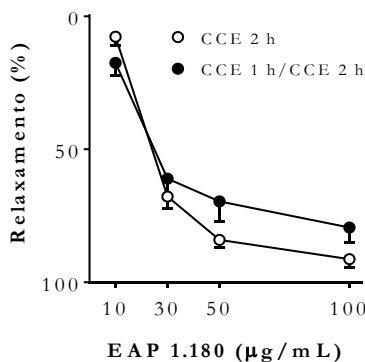
Figura 11 – Efeito da exposição pelo extrato EAP 1.180 sobre a reatividade vascular à fenilefrina e acetilcolina



Variações de contração para fenilefrina ($1 \mu\text{M}$) (A) e porcentagem de relaxamento para acetilcolina ($1 \mu\text{M}$) (B) em anéis de aorta torácica de rato, providos de endotélio funcional, controles e expostos ao extrato EAP 1.180 ($100 \mu\text{g/mL}$) durante 30 min. Os dados foram plotados em escala linear e representam a média \pm erro padrão da média ($n = 6$). Comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA de duas vias. Não foram encontradas diferenças significativas.

EAP 1.180 também não induziu mudanças significativas na sensibilidade farmacológica ou eficácia máxima vasorrelaxante, avaliados por comparação das curvas concentração-efeito cumulativas obtidas de preparações unicamente e repetidamente expostas ao extrato (Figura 12).

Figura 12 – Relações concentração-efeito para preparações unicamente e repetidamente expostas ao extrato EAP 1.180



Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição cumulativa em anéis de aorta de rato com endotélio funcional estabilizados por 2 h (CCE 2 h) e anéis estabilizados por 2 h, expostos previamente ao extrato (CCE 1 h/ CCE 2 h), ambos pré-contraídos com fenilefrina (1 µM). Os dados foram plotados em escala linear e representam a média ± erro padrão da média (n = 6). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina (1 µM). As respostas vasorrelaxantes nas preparações unicamente e repetidamente expostas ao extrato foram comparadas por ANOVA de duas vias. Não foram encontradas diferenças significativas.

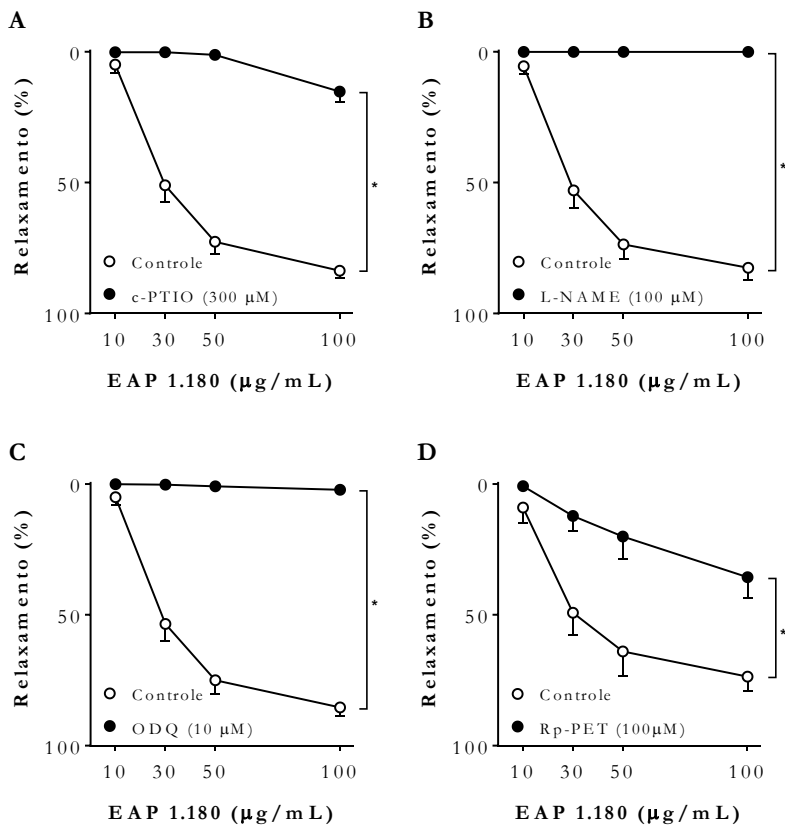
4.3 MECANISMO DE AÇÃO VASORRELAXANTE

4.3.1 O relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 depende da ativação da via da óxido nítrico sintase/guanilato ciclase solúvel/proteína cinase G

O antagonismo químico da molécula do óxido nítrico, avaliado em anéis de aorta torácica de rato pré-incubados com c-PTIO, promoveu redução significativa do efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato EAP 1.180, quando comparado ao seu efeito em anéis de aorta para controle (de $83,6 \pm 2,8\%$ nos anéis do grupo controle para $15,2 \pm 3,9\%$ nos anéis tratados com c-PTIO) (Figura 13A).

O efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato EAP 1.180 foi abolido em anéis de aorta torácica de rato pré-incubados com L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase ou em anéis pré-incubados com ODQ, um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (Figuras 13B-C). Em anéis pré-incubados com Rp-PET, um inibidor competitivo reversível seletivo da proteína cinase G, o efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato EAP 1.180 foi atenuado (de $73,6 \pm 5,7\%$ nos anéis controles para $35,6 \pm 8,1\%$ nos anéis tratados com Rp-PET) (Figura 13D).

Figura 13 – Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com antagonista do óxido nítrico, inibidor da óxido nítrico sintase, inibidor da guanilato ciclase solúvel ou inibidor da proteína cinase G

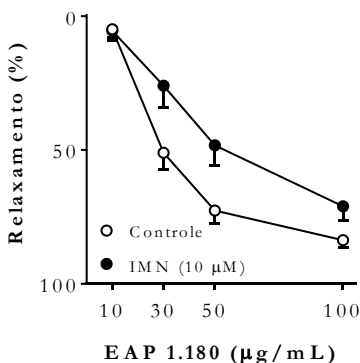


Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição cumulativa em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-incubados com c-PTIO (A), L-NAME (B), ODQ (C) ou Rp-PET (D) por 30 min e pré-contráidos com fenilefrina (1 μM). Os dados foram plotados em escala linear e representam a média ± erro padrão da média (n = 6). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina (1 μM). A resposta vasorrelaxante do EAP 1.180 nas preparações pré-incubadas foi comparada com os respectivos controles por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05.

4.3.2 A via da cicloxigenase não é determinante para o relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180

A inibição não seletiva da cicloxigenase, expressa constitutivamente nas células endoteliais, avaliada em anéis de aorta torácica de rato pré-incubados com Indometacina (IMN), não promoveu alteração significativa do efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato EAP 1.180 em comparação ao seu efeito nas preparações controle (Figura 14).

Figura 14 – Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com inibidor não seletivo da cicloxigenase

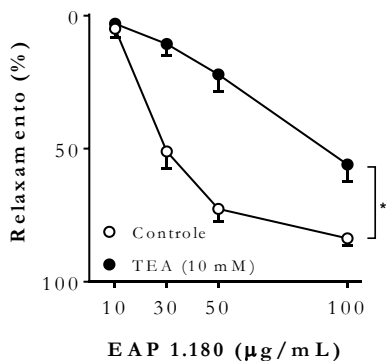


Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição cumulativa em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-incubados com Indometacina (IMN) por 30 min e pré-contráídos com fenilefrina (1 µM). Os dados foram plotados em escala linear e representam a média \pm erro padrão da média ($n = 6$). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina (1 µM). A resposta vasorrelaxante de EAP 1.180 nas preparações pré-incubadas foi comparada com os respectivos controles por ANOVA de duas vias. Não foram encontradas diferenças significativas.

4.3.3 O bloqueio não seletivo de canais para potássio atenua o relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180

O efeito vasorrelaxante promovido pelo extrato EAP 1.180 foi significativamente atenuado pelo bloqueio não seletivo de canais para potássio sensíveis a voltagem e ao cálcio em anéis de aorta pré-incubados com Tetraetilamônio (TEA, Figura 15) na concentração de 10 mM (de $83,6 \pm 2,8\%$ nos anéis do grupo controle para $55,9 \pm 6,5\%$ nos tratados com TEA).

Figura 15 – Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com bloqueador não seletivo de canais para potássio

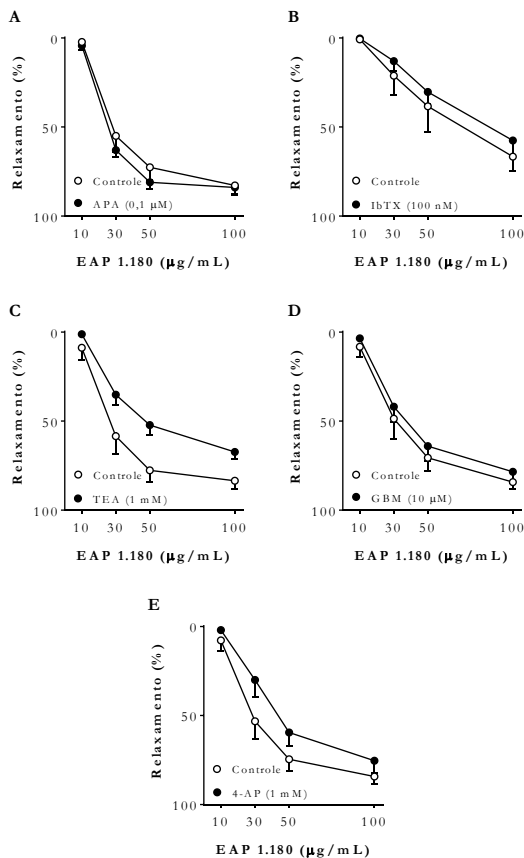


Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição cumulativa em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-incubados com Tetraetilamônio (TEA) por 30 min, pré-contráídos com fenilefrina (1 µM). Os dados foram plotados em escala linear e representam média \pm erro padrão da média ($n = 6-8$). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina (1 µM). A resposta vasorrelaxante de EAP 1.180 nas preparações pré-incubadas foi comparada com os respectivos controles por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, $*p < 0,05$.

4.3.4 O bloqueio seletivo de canais para potássio não interfere no relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180

O efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato EAP 1.180 não foi alterado quando do bloqueio seletivo de canais para potássio de baixa condutância sensíveis ao cálcio, pré-incubados com Apamina (APA, Figura 16A); do bloqueio seletivo de canais para potássio de alta condutância sensíveis ao cálcio, pré-incubados com Iberiotoxina (IbTX, Figura 16B) ou Tetraetilamonio em baixa concentração (TEA, Figura 16C); do bloqueio seletivo de canais para potássio sensíveis ao ATP, pré-incubados com Glibenclamida (GBM, Figura 16D) ou do bloqueio seletivo de canais para potássio sensíveis a voltagem em anéis pré-incubados com Fampridina (4-AP, Figura 16E)

Figura 16 – Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com bloqueadores seletivos de canais para potássio

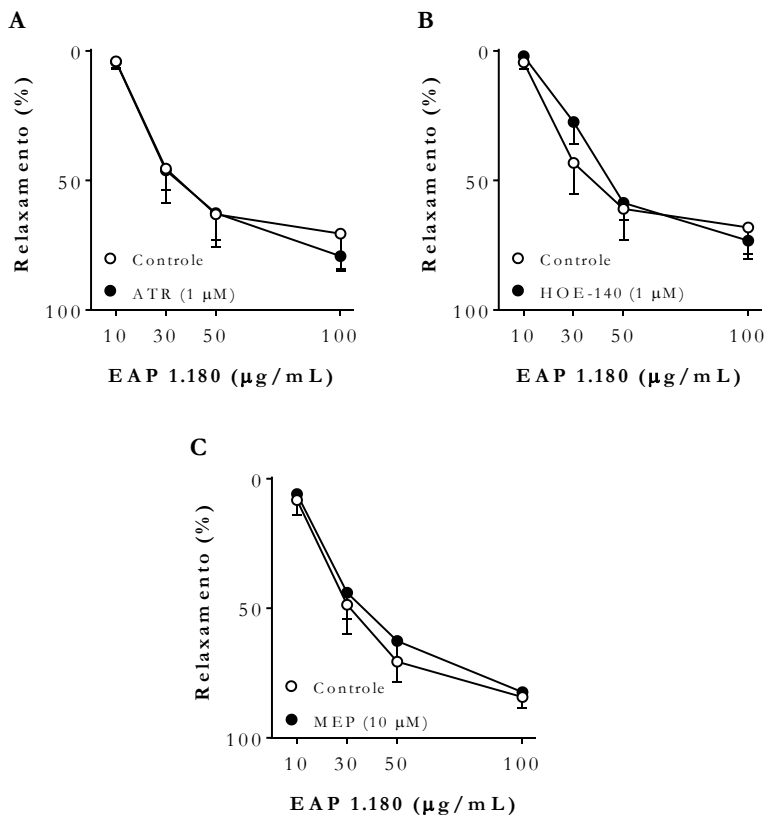


Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição gradual em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-incubados com Apamina (APA, A), Iberiotoxina (IbTX, B), Tetraetilamônio (TEA, C), Glibenclamida (GBM, D) ou Fampridina (4-AP, E) por 30 min e pré-contráidos com fenilefrina (1 µM). Os dados foram plotados em escala linear e representam média \pm erro padrão da média ($n = 6-8$). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina (1 µM). A resposta vasorrelaxante de EAP 1.180 nas preparações pré-incubadas foi comparada com os respectivos controles por ANOVA de duas vias. Não foram encontradas diferenças significativas.

4.3.5 O antagonismo de receptores para acetilcolina, bradiginina ou histamina não interfere no relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180

O efeito vasorrelaxante promovido pelo extrato EAP 1.180 não foi alterado em anéis de aorta torácica de rato pré-incubados com Atropina (ATR, Figura 17A), Icatibanto (HOE-140, Figura 17B) ou Mepiramina (MEP, Figura 17C), antagonistas farmacológicos de receptores para acetilcolina, bradiginina e histamina, respectivamente.

Figura 17 – Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com antagonistas da acetilcolina, bradicinina ou histamina

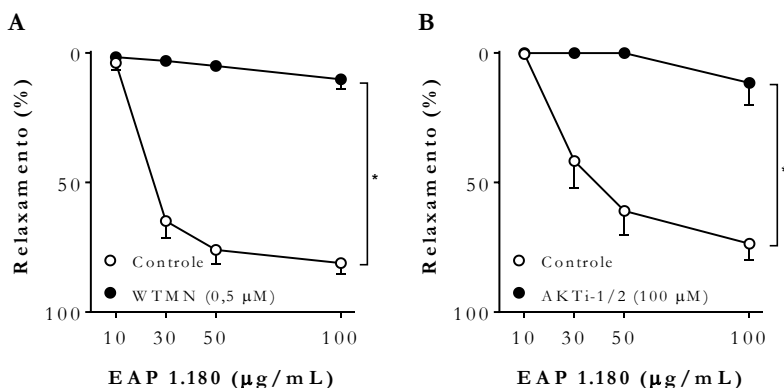


Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição gradual em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-incubados com Atropina (ATR, A), Icatibanto (HOE-140, B) ou Mepyramina (MEP, C) por 30 min e pré-contráidos com fenilefrina (1 μ M). Os dados foram plotados em escala linear e representam a média \pm erro padrão da média ($n = 5-8$). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina (1 μ M). A resposta vasorrelaxante de EAP 1.180 nas preparações pré-incubadas foi comparada com os respectivos controles por ANOVA de duas vias. Não foram encontradas diferenças significativas.

4.3.6 O relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 depende da ativação dos efetores fosfatidilinositol-3-cinase e proteína cinase B

O efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato EAP 1.180 foi significativamente atenuado quando da inibição da fosfatidilinositol-3-cinase quanto da proteína cinase B em anéis de aorta de rato pré-incubados com Wortmanina (WTMN, Figura 18A) (de $81,1\% \pm 4,2\%$ nos anéis do grupo controle para $10,1 \pm 3,8\%$ nos anéis tratados com WTMN) ou AKTi-1/2 (de $73,6 \pm 6,5\%$ nos anéis do grupo controle para $11,5 \pm 8,6\%$ nos anéis tratados com AKTi-1/2, Figura 18B), respectivamente.

Figura 18 – Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com inibidores da PI3K ou AKT

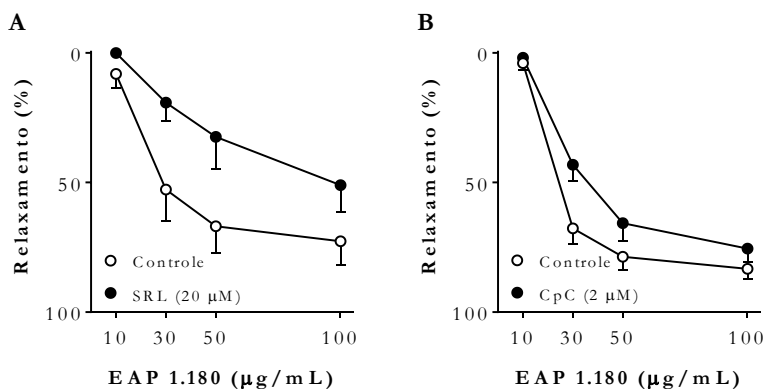


Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição cumulativa em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-incubados com Wortmanina (WTMN, A) ou Inibidor da proteína cinase B (AKTi-1/2, B) por 30 min e pré-contráídos com fenilefrina ($1 \mu\text{M}$). Os dados foram plotados em escala linear e representam média \pm erro padrão da média ($n = 7-12$). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina ($1 \mu\text{M}$). A resposta vasorrelaxante de EAP 1.180 nas preparações pré-incubadas foi comparada com os respectivos controles por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

4.3.7 O relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 não depende do alvo mecanístico para rapamicina ou da proteína cinase ativada por AMP

Não houve alterações significativas do relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 em anéis incubados com o inibidor do alvo mecanístico para a rapamicina, Sirolimo (SRL, Figura 19A) ou com o inibidor da cinase ativada por AMP, Composto C (CpC, Figura 19B).

Figura 19 – Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com inibidores do mTOR ou AMPK

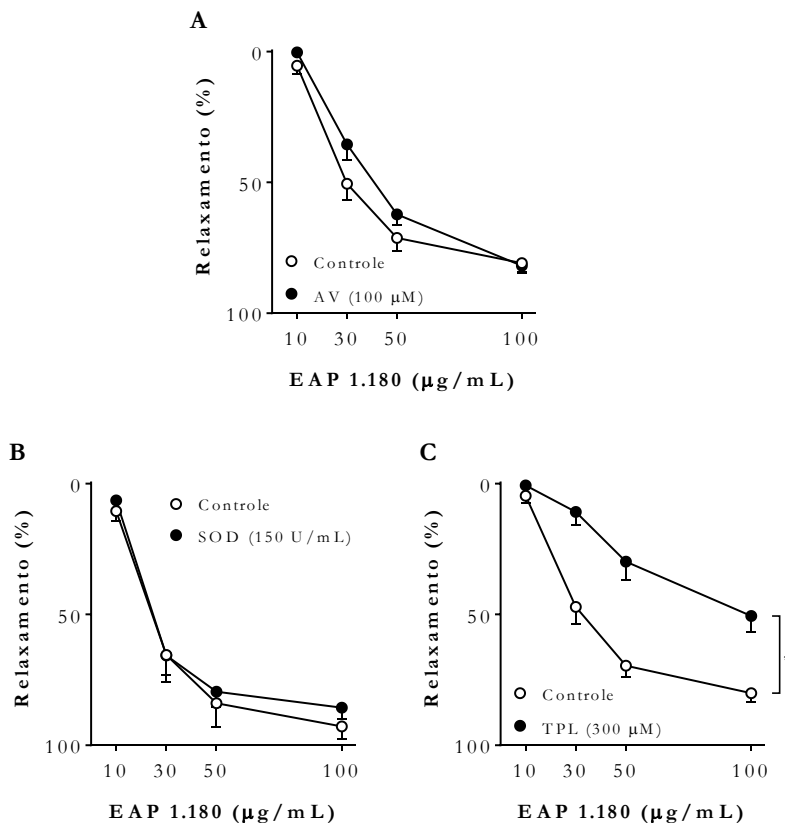


Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição cumulativa em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-incubados com Sirolimo (SRL, A) ou Composto C (CpC, B) por 30 min e pré-contraídos com fenilefrina (1 µM). Os dados foram plotados em escala linear e representam média \pm erro padrão da média ($n = 7-12$). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina (1 µM). A resposta vasorrelaxante de EAP 1.180 nas preparações pré-incubadas foi comparada com os respectivos controles por ANOVA de duas vias. Não foram encontradas diferenças significativas.

4.3.8 O relaxamento induzido pelo extrato EAP 1.180 é redox sensível

O efeito vasorrelaxante induzido pelo extrato EAP 1.180 não foi alterado quando associado aos antioxidantes Acetovanilona (AV, Figura 20A), um agente neutralizador de espécies reativas de oxigênio produzidas a partir do peróxido de hidrogênio ou Superóxido dismutase (SOD, Figura 20B), enzima responsável pela catálise da reação de dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. No entanto, o efeito de EAP 1.180 em anéis de aorta pré-incubados com Tempol (TPL, Figura 20C), um mimético da SOD, foi significativamente reduzido (de $80,1 \pm 3,4$ nos anéis do grupo controle para $50,5 \pm 5,9$ nos tratados com TPL).

Figura 20 – Relações concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 em preparações controle e incubadas com os antioxidantes acetovanilona, superóxido dismutase ou tempol



Curvas concentração-efeito para o extrato EAP 1.180 quando da sua adição cumulativa em anéis de aorta de rato com endotélio funcional pré-incubados com Acetovanilona (AV, A), Superóxido dismutase (SOD, B) ou tempol (TPPL, C) por 30 min e pré-contráídos com fenilefrina (1 µM). Os dados foram plotados em escala linear e representam média \pm erro padrão da média ($n = 6-9$). A magnitude do relaxamento foi expressa como porcentagem de redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina (1 µM). Comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho apresentou pela primeira vez, através de metodologia *in vitro*, os efeitos e possíveis mecanismos vasorrelaxantes subjacentes mediados por extratos de frutos de juçara (*Euterpe edulis* Mart.). Foram obtidos onze extratos por três técnicas de extração, tendo sido o extrato hidroalcoólico EAP 1.180 selecionado para a condução deste estudo por ser o mais potente, eficaz e/ou otimizado, quando comparado aos demais, parâmetros estes avaliados em função da sua concentração efetiva mediana, efeito máximo vasorrelaxante e teor de compostos fenólicos totais. Não detectamos uma correlação entre o teor de compostos fenólicos e a potência ou eficácia dos extratos analisados. Observação similar foi constatada por Sousa et al. (2007) ao estudar a atividade biológica de extratos obtidos de algumas plantas do semi-árido piauiense, sugerindo a existência de constituintes não fenólicos capazes de contribuir efetivamente para a ação dos extratos.

Nossos resultados sugerem que os compostos bioativos presentes no EAP 1.180 devam apresentar afinidade e atividade intrínseca por alvos presentes nas células endoteliais, uma vez que seu efeito vasorrelaxante é observado apenas quando da presença destas células no lúmen dos anéis aórticos. Como em regra os compostos bioativos só agem se estiverem ligados a alvos, conforme o princípio *corpora non agunt nisi fixata* estabelecido por Ehrlich (The Collected Papers of Paul Ehrlich, 1957) e devido à remoção mecânica do endotélio ter sido acompanhada da supressão significativa do efeito induzido pelo extrato, há indicativo de que, de fato, as células endoteliais são o alvo dos compostos presentes no EAP 1.180.

EAP 1.180 não induziu vasculotoxicidade, avaliada no nível funcional, ao se considerar a ausência de mudanças significativas da sensibilidade farmacológica ou do efeito máximo promovido pela exposição de anéis de aorta torácica de rato ao extrato, em doses únicas ou repetidas, conforme descrição metodológica de Hester e Ramos (1993).

Sabendo-se que o NO é o fator relaxante derivado do endotélio, sintetizado a partir da conversão do substrato L-arginina em L-citrulina numa reação catalisada pelas NOS, investigamos sua participação no relaxamento promovido pelo EAP 1.180 ao inibirmos a NOS em anéis pré-incubados com L-NAME, um falso substrato para esta enzima, e c-PTIO, um antagonista químico do NO (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Palmer et al., 1988; Rees et al., 1990; Yoshida et al., 1997). Observamos que o relaxamento promovido pelo EAP 1.180 foi significativamente atenuado nestes contextos, sugerindo que seu efeito vasorrelaxante se deva, pelo menos parcialmente, ao aumento da síntese ou inibição da degradação do óxido nítrico produzido pelas células endoteliais.

Resultados similares foram encontrados por Yoshida et al. (1997), ao estudar o efeito do c-PTIO no vasorrelaxamento dependente do endotélio induzido por mediadores em diferentes vasos de coelho, incluindo aorta torácica, tendo sido demonstrada a importância deste agente farmacológico para avaliação da contribuição fisiológica do óxido nítrico no tônus vascular e no fluxo sanguíneo regional. Rees et al. (1990), em estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstrou a importância da utilização de diferentes inibidores da óxido nítrico sintase endotelial, incluindo o L-NAME, para a confirmação da síntese do NO e avaliação do seu papel na regulação do fluxo e pressão sanguínea.

É também comprovado ser a guanilato ciclase solúvel um dos alvos farmacológicos constitutivos para o NO, enzima esta responsável pela reação de conversão do GTP em GMPc, sendo este último o segundo mensageiro a jusante capaz de desencadear uma variedade de respostas biológicas, incluindo o relaxamento da musculatura lisa vascular (Moncada et al., 1991; Denninger e Marletta, 1999; Schmidt et al., 2003), bem como é demonstrado a existência de compostos diferentes do NO capazes de modular a guanilato ciclase solúvel e aumentar a acumulação de GMPc em vários tecidos (Arnold et al., 1977). Observamos que ao inibirmos seletivamente esta enzima com ODQ, a resposta vasorrelaxante induzida pelo EAP 1.180 foi significativamente atenuada. Devido ao ODQ ser considerado o primeiro inibidor seletivo a atuar no receptor constitutivo do NO, representando uma ferramenta única e poderosa para elucidação da significância fisiológica da via NOS/GCs (Garthwaite et al., 1995; Olson et al., 1997), nossos resultados indicam que o efeito vasorrelaxante induzido pelo EAP 1.180 é dependente da produção de GMPc, entretanto, parece ser pouco provável que os compostos bioativos presentes no extrato sejam capazes de modular diretamente a guanilato ciclase para indução de efeito vasorrelaxante, uma vez que nos experimentos realizados em anéis de aorta torácica pré-incubados com c-PTIO ou L-NAME, contextos estes em que teoricamente a guanilato ciclase estava constitutivamente ativa, o extrato não foi capaz de induzir vasorrelaxamento significativo quando comparado ao seu efeito nas preparações controles.

Outras enzimas também podem ser alvos diretos do NO produzido e liberado pelas células endoteliais, como as cicloxigenases, responsáveis pela biossíntese de mediadores vasorrelaxantes, a exemplo da prostaciclina (PGI₂), capaz de induzir a formação de AMPc, levando a um efeito sinérgico em células efetoras, e.g. células musculares lisas, através do qual as NOS e COX amplificam suas respostas fisiológicas ou patológicas (Moncada et al., 1977; Tateson et al., 1977; Hyslop e De Nucci, 1991; Salvemini et al., 1993). Entretanto, não evidenciamos diferenças

significativas quanto ao relaxamento induzido pelo EAP 1.180 ao inibirmos as COX com indometacina, indicando que a geração de prostaciclina pela via da COX não está aparentemente envolvida ou não é determinante para o efeito do extrato. Além do mais, evidências apontam ser especificamente a via NOS/GCs/PKG a principal na modulação das respostas contráteis e relaxantes nas células musculares lisas, verificada em camundongos knockout para PKG (Bonnevier et al., 2004).

O GMPc, ao ser gerado por ação da guanilato ciclase solúvel, interage alostericamente com proteínas serina/treonina cinases dependentes de GMPc (PKG), proteínas estas capazes de catalisar a fosforilação de diferentes alvos relevantes para a regulação do tônus da musculatura lisa vascular, a exemplo da fosforilação da subunidade de ligação a miosina da fosfatase da cadeia leve de miosina ou fosforilação de canais para potássio, ativando-os para a indução subsequente do efeito relaxante muscular (Johnson e Lincoln, 1985; Archer et al., 1994; Lincoln et al., 2001). Ao inibirmos esta cinase com Rp-8-Br-PET-cGMPs, um antagonista competitivo do GMPc, observamos que o relaxamento induzido pelo EAP 1.180 foi significativamente atenuado, sugerindo a participação da PKG neste efeito, embora tenhamos observado um notório relaxamento parcial nestas preparações, se comparado ao efeito do EAP 1.180 nos anéis controles ou nos anéis incubados com ODQ.

Sabe-se que o Rp-8-Br-PET-cGMPs é um antagonista competitivo moderadamente efetivo do GMPc (Butt et al., 1990), podendo o seu efeito inibitório ter sido suplantado em decorrência dos aumentos cumulativos das concentrações do EAP 1.180 durante a realização da curva concentração-efeito, com consequente indução da produção de GMPc ou inibição da sua degradação, levando a superabilidade parcial do bloqueio imposto a PKG, expresso através do efeito vasorrelaxante atenuado para o EAP 1.180. Essa possibilidade é suportada por trabalhos preliminares que reportam ser as antocianinas os principais compostos com atividade biológica presentes nos frutos de *Euterpe edulis* Mart. (Borges et al., 2011; Inacio et al., 2013; Bicudo et al., 2014). Sendo as antocianinas compostos naturais pertencentes ao grupo dos flavonoides e sendo os flavonoides considerados potenciais inibidores seletivos da fosfodiesterase, enzima responsável pela catálise da hidrólise do GMPc e sua consequente inativação, a inibição desta enzima pelas antocianinas, provavelmente presentes no EAP 1.180, poderia ter levado ao aumento dos níveis intracelulares de GMPc para a continuidade da via NOS/GMPc/PKG nos anéis tratados com análogo do GMPc (Ruckstuhl et al., 1979; Turko et al., 1999). O Rp-8-Br-PET-cGMPs também é capaz de exercer efeito agonista parcial da PKG em algumas circunstâncias, conforme indicam os achados de Valtcheva et al. (2009). Os autores também recomendam cautela na

interpretação dos dados obtidos com a utilização deste inibidor da PKG e que os mesmos não devam ser usados como critério único de evidência do envolvimento desta cinase nos processos de sinalização celular.

Além da PKG, é descrito que o NO e o GMPc modulam vários tipos de canais para potássio, os quais estão envolvidos na regulação do potencial de membrana e tônus vascular, sendo considerados a via dominante de condução iônica nas células musculares (Williams et al., 1988; Archer et al., 1994; Bolotina et al., 1994; Nelson e Quayle, 1995; Jackson, 2000). Neste sentido, investigamos a participação de alguns tipos de canais para K^+ no mecanismo vasorrelaxante induzido pelo EAP 1.180. Ao utilizarmos tetraetilamônio (10 mM), um bloqueador não seletivo da maioria dos canais para K^+ (Cook, 1989), constatamos uma atenuação significativa do relaxamento induzido pelo extrato. Avaliamos seletivamente se os canais para K^+ de alta condutância sensíveis ao Ca^{2+} (BK_{Ca}) bloqueados pela iberiotoxina ou tetraetilamônio (1 mM) (Langton et al., 1991; Candia et al., 1992); os de baixa condutância sensíveis ao Ca^{2+} (SK_{Ca}) bloqueados pela apamina (Messier et al., 1991); os sensíveis a voltagem (K_v) bloqueados pela fampridina (Choquet e Korn, 1992) ou os sensíveis ao ATP (K_{ATP}) bloqueados pela glibenclamida (Link et al., 1999) poderiam interferir no mecanismo vasorrelaxante induzido pelo EAP 1.180, não havendo diferenças significativas.

As divergências evidenciadas para o perfil de relaxamento induzido pelo EAP 1.180 quando do bloqueio não seletivo e seletivo dos canais para K^+ podem ser justificadas em razão da provável variabilidade morfológica para estes canais existente na aorta torácica. É demonstrada heterogeneidade para diferentes receptores de fármacos nas células musculares lisas em segmentos de aorta torácica, havendo aparentemente uma absoluta e progressiva perda para a maioria dos receptores partindo do arco aórtico em direção a extremidade posterior, próxima ao diafragma (Altura e Altura, 1970). Numa interpretação teleológica, esta variação da densidade de receptores também poderia ser considerada para os canais de K^+ presentes no músculo liso vascular dos anéis isolados de aorta utilizados nos nossos experimentos, alterando a sensibilidade para os bloqueadores utilizados. Diferenças fenotípicas e eletrofisiológicas já foram estabelecidas em células musculares lisas de artérias pulmonares de rato, tendo sido identificado fenótipos celulares distintos, expressando primariamente BK_{Ca} , K_v ou populações variadas de canais em densidades diferentes ao longo da circulação pulmonar arterial de condutância e resistência (Archer, 2001). Não se pode descartar, portanto, a possibilidade dos canais para potássio aparentemente não envolvidos no efeito do extrato de *Enterpe edulis* Mart. e de outros, não abordados neste estudo, de participarem do mecanismo vasorrelaxante induzido pelo EAP 1.180,

fazendo-se necessário a investigação do envolvimento destes canais em outros leitos vasculares, tendo em vista as diferenças regionais de morfologia e função vascular presentes em artérias de condutância e resistência, já demonstradas na literatura (Sausbier et al., 2000; Hilgers et al., 2006; Souza et al., 2008).

Embora haja evidências para a atividade vasodilatadora promovida por algumas classes de compostos naturais, inclusive as dos presentes no EAP 1.180, ser dependente do endotélio através da via NOS/GCs, a capacidade indutora de produção do óxido nítrico envolve múltiplas vias de sinalização intracelular (Andriambeloson et al., 1998; Nakamura et al., 2002; Schini-Kerth et al., 2011; Zhu et al., 2011; Lundberg et al., 2015). Nas células endoteliais da aorta torácica de rato, a eNOS está compartimentalizada no interior de estruturas ricas em colesterol denominadas cavéolas. Estas estruturas funcionam como um sítio de integração que liga estímulos extracelulares a efetores intracelulares para a sua ativação (Feron et al., 1996; Linder et al., 2005). Devido a existência de receptores de membrana nas células endoteliais, a exemplo dos receptores acoplados a proteína G M_3 , B_2 e H_1 , capazes de se translocar para as cavéolas mediante ligação a seus respectivos agonistas. i.e. acetilcolina, bradicinina e histamina, e ativar a eNOS através de sinalização cálcio-dependente (Raposo et al., 1987; Isshiki et al., 1998; Lantoiné et al., 1998), avaliamos se o antagonismo de tais receptores, promovido pela atropina, icatibanto ou mepiramina, poderia alterar o relaxamento induzido pelo EAP 1.180, não sendo evidenciado diferenças significativas e excluindo, portanto, o envolvimento destes receptores no mecanismo vasorrelaxante induzido pelo extrato. Achados similares também foram encontrados por Rocha et al. (2007), ao estudar os mecanismos envolvidos no efeito vasorrelaxante de extrato obtido de frutos de *Enterpe oleracea* Mart. em leito mesentérico.

Compostos naturais também podem modular a via PI3K/AKT, levando a ativação da eNOS através de sinalização cálcio-independente, por fosforilação do resíduo de serina 1177 e aumento da produção de NO (Dimmeler et al., 1999). Observamos que ao inibirmos a PI3K com wortmanina, um inibidor não competitivo irreversível seletivo (Powis et al., 1994), houve uma atenuação significativa do relaxamento induzido pelo EAP 1.180. De forma semelhante, ao utilizarmos o inibidor alostérico reversível seletivo da AKT (Lindsley et al., 2005), o efeito vasorrelaxante máximo induzido pelo extrato foi significativamente reduzido, indicando que os compostos bioativos presentes no EAP 1.180 devam estimular a fosforilação da eNOS através da ativação da AKT a jusante pela PI3K para promoção do efeito vasorrelaxante. Além da eNOS, a AKT também é capaz de fosforilar mais de 9000 proteínas em células de mamíferos, não

tendo ainda sido elucidada a relevância biológica destes outros alvos (Yaffe et al., 2001). Fármacos anti-hipertensivos, a exemplo do alisquirreno, considerado o primeiro inibidor efetivo de renina a ser usado na clínica, e telmisartana, um antagonista de receptor para angiotensina 2 do subtipo AT₁, também exercem efeitos cardioprotetores e anti-hipertensivos através da via PI3K/AKT/eNOS, verificado em ratos espontaneamente hipertensos (Xu e Liu, 2013; Zhang et al., 2014). Ambos os fármacos têm seu uso aprovado pela ANVISA e são comercializados sob os nomes Rasilez (Novartis) e Micardis (Boehringer Ingelheim), respectivamente.

A proteína mTOR é um importante efetor da via PI3K/AKT, capaz de ativar a AKT por fosforilação do resíduo de serina 473. Para investigarmos se a inibição do mTOR poderia influenciar o relaxamento induzido pelo EAP 1.180, utilizamos sirolimo, um inibidor alostérico irreversível seletivo (Heitman et al., 1991), não sendo evidenciadas diferenças significativas para o relaxamento induzido pelo extrato. Alguns trabalhos reportam a existência de múltiplas alças de retroalimentação regulatórias existentes na via PI3K/AKT (Dienstmann et al., 2014; Rozengurt et al., 2014). Uma dessas alças leva a ativação da AKT por retroalimentação negativa através da inibição de mTOR pelo sirolimo (Wan et al., 2006). Embora não se saiba ao certo as implicações fisiológicas desta alça, é possível que a manutenção da AKT constitutivamente ativa, num contexto vascular, tenha garantido a normalidade da ativação da eNOS quando da exposição dos anéis de aorta, pré-tratados com sirolimo, a concentrações cumulativas e crescentes do extrato EAP 1.180.

A AMPK é a única cinase, até então identificada, capaz de potencialmente fosforilar a eNOS em mais de um sítio, nos resíduos de serina 633 e 1177, ambos estimulatórios, e no resíduo de treonina 495, inibitório. (Chen et al., 1999; Fleming et al., 2001; Morrow et al., 2003; Chen et al., 2009; Fisslthaler e Fleming, 2009). Em estudo realizado por Davis et al. (2006), em aorta de camundongo, foi constatado que a metformina, um dos fármacos mais comuns utilizados para o tratamento do diabetes tipo 2, ativa a AMPK por mecanismo dependente de proteínas de choque térmico (HSP 90), levando a fosforilação da eNOS e aumentando a bioatividade para o NO. Considerando este estudo e a possibilidade de a AMPK ser mais um alvo potencial para o extrato EAP 1.180 induzir efeito vasorrelaxante, inibimos esta cinase com o composto C, um inibidor competitivo reversível não seletivo (Zhou et al., 2001; Bain et al., 2007), não sendo observadas alterações significativas para o efeito induzido pelo EAP 1.180. Embora o composto C seja o inibidor da AMPK mais amplamente utilizado, o mesmo também é capaz de inibir, com potência similar ou até maior, outras proteínas cinases (Bain et al., 2007). Peyton et al. (2011) recomenda cautela no uso deste agente

farmacológico para a identificação das funções vasculares da AMPK. Além do mais, a falta de inibidores alternativos é uma limitação dentro do campo de pesquisa envolvendo esta cinase (Dong, 2013), podendo ser contornada com a utilização de metodologias alternativas, a exemplo do uso de camundongos knockout para a AMPK (Goirand et al., 2007). A AMPK também é capaz de fosforilar pelo menos 20 alvos fisiológicos relevantes (Towler e Hardie, 2007), não sendo a eNOS o seu alvo enzimático exclusivo.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas endogenamente, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO\bullet$), estão envolvidas na patogênese da hipertensão arterial e são capazes de regular diversas vias de sinalização redox sensíveis, induzindo modificações estruturais e/ou funcionais dos seus alvos (Paravicini e Touyz, 2006; Ray et al., 2012). As ROS celulares também podem resultar de interações com fontes exógenas oriundas de compostos xenobióticos, a exemplo dos compostos fenólicos, capazes de gerar espécies reativas por processos mediados por receptores inespecíficos de membrana celular, autoxidação ou por geração espontânea de H_2O_2 (Mochizuki et al., 2002; Elbling et al., 2005; Kim et al., 2007). Em estudo conduzido por Elbling et al. (2005) foi evidenciado que concentrações subtóxicas e tóxicas de compostos fenólicos induzem estresse oxidativo mediado por H_2O_2 . Kim et al. (2007) propõe que o efeito benéfico dos compostos fenólicos pode, de fato, depender de suas habilidades de se comportarem como pró-oxidantes, levando a produção de ROS em determinados contextos fisiológicos que iniciam eventos agudos de sinalização intracelular. Ziberna et al. (2013) especula que a atividade vasodilatadora dos compostos fenólicos é meramente um efeito colateral induzido por mecanismos de defesa do endotélio, incorporando aumento da produção de NO em oposição ao aumento repentino do estresse oxidativo celular.

Nesse contexto, para avaliação da influência das ROS sobre o efeito vasorrelaxante do EAP 1.180, anéis de aorta foram inicialmente incubados com acetovanilona, um fármaco predominantemente antioxidante de células endoteliais e musculares lisas, responsável por neutralizar H_2O_2 , embora este mecanismo ainda não esteja totalmente esclarecido (Heumuller et al., 2008; Touyz, 2008). Nossos achados, entretanto, apontam não haver diferenças significativas entre o relaxamento induzido pelo EAP 1.180 em anéis controles e tratados com acetovanilona.

A SOD, enzima responsável pela catálise do O_2^- em O_2 e H_2O_2 , está presente no citoplasma, nas mitocôndrias e no espaço extracelular, a exemplo da parede das artérias, sendo considerada uma das enzimas

antioxidantes naturais mais potentes, embora possa ser facilmente inibida por uma variedade de agentes incluindo ácidos e o próprio peróxido de hidrogênio (Rubin e Orton, 2001; Fattman et al., 2003; Nozik-Grayck et al., 2005). Avaliamos o efeito da SOD sobre o relaxamento induzido por EAP 1.180, não havendo diferenças significativas entre o relaxamento induzido pelo extrato em anéis controles e tratados.

Para Fitzpatrick et al. (1995), a ausência de alterações no perfil de relaxamento, resultante da inibição de processos degradativos do NO pode ser devido à capacidade basal de síntese do NO ser baixa o suficiente para resultar em relaxamentos significativos. Os autores argumentam que é mais provável que os extratos de plantas que causam relaxamento dependente do endotélio exerçam seus efeitos por geração de NO e não por inibição da sua inativação.

Em anéis de aorta incubados com tempol, um mimético da SOD, o relaxamento máximo promovido pelo EAP 1.180 foi significativamente diferente em comparação ao controle. Segundo Wilcox e Pearlman (2008), concentrações de tempol na faixa de 10^{-4} a 10^{-2} M podem levar a efeitos pró-oxidantes nas células musculares lisas e endoteliais devido a habilidade dual do O_2^- iniciar e terminar a peroxidação lipídica, porém Haj-Yehia et al. (1999) observou que, ao ser incubado tempol em anéis de aorta na concentração de $5 \cdot 10^{-3}$ M, dentro da faixa anteriormente citada, foi abolida a diferença de relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis controle e expostos a contextos de estresse oxidativo. Ao usarmos tempol na concentração de $3 \cdot 10^{-4}$ M, foi constatado redução significativa do efeito máximo vasorrelaxante induzido pelo EAP 1.180 nos anéis tratados. Possivelmente, tempol e EAP 1.180 exerceram efeitos pró-oxidantes aditivos que se sobrepuseram à produção rebote de NO pelas células endoteliais, levando ao estresse oxidativo e comprometendo o relaxamento vascular. Outra possibilidade a ser considerada seria a do tempol, ao exercer efeito antioxidante nos anéis tratados, contribuir para o aumento da biodisponibilidade do NO, levando a inibição da eNOS por retroalimentação negativa¹ e comprometendo a produção excedente de NO em exposição a EAP 1.180.

Poljsak et al. (2013) considera a avaliação do estresse oxidativo limitada devido a existência de critérios diferentes de estresse e ausência de uma escala universal de mensuração, sendo prudente a utilização combinada de diferentes metodologias e biomarcadores, já explorada na literatura para extratos de *Euterpe edulis* Mart. (Lima et al., 2012; Bicudo et al., 2014; Cardoso et al., 2015).

¹Os mecanismos de retroalimentação negativa promovidos pelo NO já foram descritos na literatura por Assreuy et al. (1993).

Assim como Tanko e Matrougui (2002), nos perguntamos se poderíamos extrapolar para vasos de resistência os resultados obtidos em vaso de condutância (aorta) do efeito vasorrelaxante induzido pelo EAP 1.180 e devido às diferenças na estrutura anatômica e dos níveis de significância e responsividade das respostas contráteis e relaxantes existentes em diferentes leitos, os resultados aqui apresentados são sugestivos e não conclusivos do efeito vasorrelaxante induzido pelo EAP 1.180, podendo estes resultados serem revisitados em estudos futuros.

6 CONCLUSÃO

Os extratos obtidos dos frutos de *Euterpe edulis* Mart. apresentam compostos bioativos indutores de efeito vasorrelaxante através de múltiplas vias de transdução endoteliais, verificado em modelo experimental in vitro, utilizando-se anéis de aorta de ratos saudáveis.

REFERÊNCIAS

- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Heterogeneity of drug receptors in different segments of rabbit thoracic aorta. **Eur J Pharmacol**, v. 12, n. 1, p. 44-52, 1970.
- ANDRIAMBELOSON, E. et al. Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. **J Nutr**, v. 128, n. 12, p. 2324-2333, 1998.
- ANGUS, J. A.; WRIGHT, C. E. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 44, n. 2, p. 395-407, 2000.
- ARCHER, S. The Role of Potassium Channels in the Control of the Pulmonary Circulation. In: ARCHER, S. L. e RUSCH, N. J. (Ed.). **Potassium Channels in Cardiovascular Biology**. Boston, MA: Springer US, 2001. p. 543-570.
- ARCHER, S. L. et al. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 16, p. 7583-7587, 1994.
- ARNOLD, W. P. et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.
- ASSREUY, J. et al. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. **Br J Pharmacol**, v. 108, n. 3, p. 833-837, 1993.
- BAIN, J. et al. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. **Biochem J**, v. 408, n. 3, p. 297-315, 2007.
- BICUDO, M.; RIBANI, R.; BETA, T. Anthocyanins, phenolic acids and antioxidant properties of juçara fruits (*Euterpe edulis* M.) along the on-tree ripening process. **Plant Foods Hum Nutr**, v. 69, n. 2, p. 142-147, 2014.
- BOLOTINA, V. M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.

BONNEVIER, J. et al. Modulation of Ca^{2+} sensitivity by cyclic nucleotides in smooth muscle from protein kinase G-deficient mice. **J Biol Chem**, v. 279, n. 7, p. 5146-5151, 2004.

BORGES, G. et al. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the atlantic forest in southern Brazil. **Food Res Int**, v. 44, n. 7, p. 2128-2133, 2011.

BURNIER, M.; VUIGNIER, Y.; WUERZNER, G. State-of-the-art treatment of hypertension: established and new drugs. **Eur Heart J**, v. 35, n. 9, p. 557-562, 2014.

BUTT, E. et al. Inhibition of cGMP-dependent protein kinase by (Rp)-guanosine 3',5'-monophosphorothioates. **FEBS Letters**, v. 263, n. 1, p. 47-50, 1990.

CANDIA, S.; GARCIA, M. L.; LATORRE, R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel. **Biophys J**, v. 63, n. 2, p. 583-590, 1992.

CARDOSO, A. L. et al. Acute consumption of juçara juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. **J Funct Foods**, v. 17, p. 152-162, 2015.

CHEN, Z. et al. AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633. **Circ Res**, v. 104, n. 4, p. 496-505, 2009.

CHEN, Z. P. et al. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. **FEBS Lett**, v. 443, n. 3, p. 285-289, 1999.

CHOBANIAN, A. V. et al. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1206-1252, 2003.

CHOQUET, D.; KORN, H. Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes. **J Gen Physiol**, v. 99, n. 2, p. 217-240, 1992.

COFFMAN, T. M. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. **Nat Med**, v. 17, n. 11, p. 1402-1409, 2011.

The Collected Papers of Paul Ehrlich. **Proc R Soc Med**, v. 50, n. 3, p. 210-210, 1957.

CONSTANCIO, V. D. S. **Efeito da jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), do fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) e do jambolão (*Syzgium cumini*) sobre o perfil lipídico, a glicemia e a endotoxemia em camundongos submetidos à dieta de cafeteria.** 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre.

COOK, N. S. Effect of Some Potassium Channel Blockers on Contractile Responses of the Rabbit Aorta. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 13, n. 2, p. 299-306, 1989.

DAVIS, B. J. et al. Activation of the AMP-Activated Kinase by Antidiabetes Drug Metformin Stimulates Nitric Oxide Synthesis In Vivo by Promoting the Association of Heat Shock Protein 90 and Endothelial Nitric Oxide Synthase. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 496-505, 2006.

DE LOLIO, C. A. Epidemiologia da hipertensão arterial. **Rev Saúde Publ**, v. 24, n. 5, p. 425-432, 1990.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334-350, 1999.

DHARMASHANKAR, K.; WIDLANSKY, M. E. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. **Curr Hypertens Rep**, v. 12, n. 6, p. 448-455, 2010.

DIENSTMANN, R. et al. Picking the Point of Inhibition: A Comparative Review of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors. **Mol Cancer Ther**, v. 13, n. 5, p. 1021-1031, 2014.

DIMMELER, S. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 601-605, 1999.

DONG, Y. **Mechanism underlying the anticontractile effect of perivascular adipose tissue.** 2013. 174 f. Tese (Doctor of Philosophy).

Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester, Manchester.

ELBLING, L. et al. Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities.

FASEB J, v. 19, n. 7, p. 807-809, 2005.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ Health Perspect**, v. 109 Suppl 1, p. 69-75, 2001.

FATTMAN, C. L.; SCHAEFER, L. M.; OURY, T. D. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 3, p. 236-256, 2003.

FERON, O. et al. Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 271, n. 37, p. 22810-22814, 1996.

FISSLTHALER, B.; FLEMING, I. Activation and Signaling by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells. **Circ Res**, v. 105, n. 2, p. 114-127, 2009.

FITZPATRICK, D. F.; HIRSCHFIELD, S. L.; COFFEY, R. G. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 265, n. 2, p. H774-H778, 1993.

FITZPATRICK, D. F. et al. Endothelium-dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 26, n. 1, p. 90-95, 1995.

FLEMING, I. et al. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. **Circ Res**, v. 88, n. 11, p. E68-E75, 2001.

FUJIMURA, Y. et al. Green tea polyphenol EGCG sensing motif on the 67-kDa laminin receptor. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37942, 2012.

GARTHWAITE, J. et al. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol Pharmacol**, v. 48, n. 2, p. 184-188, 1995.

GOIRAND, F. et al. Activation of AMP kinase alpha1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice. **J Physiol**, v. 581, n. Pt 3, p. 1163-1171, 2007.

GORDALIZA, M. Terpenyl-purines from the sea. **Mar Drugs**, v. 7, n. 4, p. 833-49, 2009.

GRADMAN, A. H. et al. Combination therapy in hypertension. **J Am Soc Hypertens**, v. 4, n. 1, p. 42-50, 2010.

HAIJ-YEHIA, A. I. et al. Effects of the superoxide dismutase-mimic compound TEMPOL on oxidant stress-mediated endothelial dysfunction. **Antioxid Redox Signal**, v. 1, n. 2, p. 221-232, 1999.

HEITMAN, J.; MOVVA, N. R.; HALL, M. N. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 905-909, 1991.

HESTER, R. K.; RAMOS, K. S. Vessel Cylinders. In: FRAZIER, C. A. T. M. (Ed.). **In Vitro Biological Systems**: Academic Press, v.1, 1993. cap. 15, p.169-181.

HEUMULLER, S. et al. Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 211-217, 2008.

HILGERS, R. H.; TODD, J., JR.; WEBB, R. C. Regional heterogeneity in acetylcholine-induced relaxation in rat vascular bed: role of calcium-activated K⁺ channels. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 1, p. H216-H222, 2006.

HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The mechanisms and significance of the coupled release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and prostacyclin (PGI₂) from endothelial cells. **Wien Klin Wochenschr**, v. 103, n. 14, p. 422-434, 1991.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. **Hypertension**, v. 16, n. 5, p. 477-483, 1990.

_____. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. **Blood Vessels**, v. 28, n. 1-3, p. 67-73, 1991.

IGNARRO, L. J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987.

INACIO, M. R. et al. Total anthocyanin content determination in intact acai (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-jucara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chem**, v. 136, n. 3-4, p. 1160-1164, 2013.

Institute for Healthcare Informatics. **The Use of Medicines in the United States: Review of 2011**, Parsippany, 2012.

ISSHIKI, M. et al. Endothelial $\text{Ca}(2+)$ waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 9, p. 5009-5014, 1998.

JACKSON, W. F. Ion Channels and Vascular Tone. **Hypertension**, v. 35, n. 1 Pt 2, p. 173-178, 2000.

JESPERSEN, B. et al. Measurement of smooth muscle function in the isolated tissue bath-applications to pharmacology research. **J Vis Exp**, n. 95, p. 52324, 2015.

JOHNSON, R. M.; LINCOLN, T. M. Effects of nitroprusside, glyceryl trinitrate, and 8-bromo cyclic GMP on phosphorylase a formation and myosin light chain phosphorylation in rat aorta. **Mol Pharmacol**, v. 27, n. 3, p. 333-342, 1985.

KANNEL, W. B. Blood pressure as a cardiovascular risk factor: prevention and treatment. **JAMA**, v. 275, n. 20, p. 1571-1576, 1996.

KENAKIN, T. Isolated Blood Vessel Assays. In: (Ed.). **Current Protocols in Pharmacology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, n. 2, p. 2328-75, 2013.

KIM, H.-S.; QUON, M. J.; KIM, J.-A. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biol**, v. 2, p. 187-195, 2014.

KIM, J.-A. et al. Epigallocatechin Gallate, a Green Tea Polyphenol, Mediates NO-dependent Vasodilation Using Signaling Pathways in Vascular Endothelium Requiring Reactive Oxygen Species and Fyn. **J Biol Chem**, v. 282, n. 18, p. 13736-13745, 2007.

KO, E. A. et al. Tension measurement in isolated rat and mouse pulmonary artery. **Drug Discov Today Dis Models**, v. 7, n. 3-4, p. 123-130, 2010.

KOHLMANN JR., O. et al. III Consenso Brasileiro de Hipertensão Arterial. **ABEM**, v. 43, p. 257-286, 1999.

LANGTON, P. D. et al. Block of calcium-activated potassium channels in mammalian arterial myocytes by tetraethylammonium ions. **Am J Physiol**, v. 260, n. 3 Pt 2, p. H927-H934, 1991.

LANTOINE, F. et al. Nitric oxide production in human endothelial cells stimulated by histamine requires Ca^{2+} influx. **Biochem J**, v. 330, n. Pt 2, p. 695-699, 1998.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161-165, 2009.

LIMA, C. P. et al. Conteúdo polifenólico e atividade antioxidante dos frutos da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius). **Rev Bras Plantas Med**, v. 14, p. 321-326, 2012.

LINCOLN, T. M.; DEY, N.; SELLAK, H. Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. **J Appl Physiol**, v. 91, n. 3, p. 1421-1430, 2001.

LINDER, A. E. et al. Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 1, p. 9-15, 2005.

LINDSLEY, C. W. et al. Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 15, n. 3, p. 761-764, 2005.

LINK, M. S. et al. Selective activation of the K⁽⁺⁾(ATP) channel is a mechanism by which sudden death is produced by low-energy chest-wall impact (Commotio cordis). **Circulation**, v. 100, n. 4, p. 413-418, 1999.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 14, n. 9, p. 623-641, 2015.

MAESTRO, A. et al. Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. **Cardiovasc Res**, v. 85, n. 1, p. 175-183, 2010.

MANCIA, G. et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **J Hypertens**, v. 31, n. 7, p. 1281-1357, 2013.

MESSIER, C. et al. Effect of apamin, a toxin that inhibits Ca²⁺-dependent K⁺ channels, on learning and memory processes. **Brain Res**, v. 551, n. 1, p. 322-326, 1991.

MOCHIZUKI, M. et al. Kinetic analysis and mechanistic aspects of autooxidation of catechins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1569, n. 1-3, p. 35-44, 2002.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thromb Res**, v. 11, n. 3, p. 323-344, 1977.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORROW, V. A. et al. Direct Activation of AMP-activated Protein Kinase Stimulates Nitric-oxide Synthesis in Human Aortic Endothelial Cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 31629-31639, 2003.

NAKAMURA, Y.; MATSUMOTO, H.; TODOKI, K. Endothelium-Dependent Vasorelaxation Induced by Black Currant Concentrate in Rat Thoracic Aorta. **Jpn J Pharmacol**, v. 89, n. 1, p. 29-35, 2002.

NELSON, M. T.; QUAYLE, J. M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol**, v. 268, n. 4 Pt 1, p. C799-C822, 1995.

NICOSIA, R.; ZHU, W.-H. Rat Aortic Ring Assay of Angiogenesis. In: AUGUSTIN, H. (Ed.). **Methods in Endothelial Cell Biology**: Springer Berlin Heidelberg, 2004. cap. 13, p.125-144.

NOZIK-GRAYCK, E.; SULIMAN, H. B.; PIANTADOSI, C. A. Extracellular superoxide dismutase. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 12, p. 2466-2471, 2005.

OIGMAN, W. Bases hemodinâmicas da hipertensão arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 49, n. 5, p. 303-308, 1987.

OLSON, L. J. et al. Selective guanylyl cyclase inhibitor reverses nitric oxide-induced vasorelaxation. **Hypertension**, v. 29, n. 1 Pt 2, p. 254-261, 1997.

OPARIL, S.; SCHMIEDER, R. E. New Approaches in the Treatment of Hypertension. **Circ Res**, v. 116, n. 6, p. 1074-1095, 2015.

Organização Mundial da Saúde. **Arterial hypertension : report of a WHO expert committee**, Geneva, 1978.

Organização Mundial da Saúde. **A global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis**, Geneva, 2013.

PADWAL, R.; STRAUS, S. E.; MCALISTER, F. A. Cardiovascular risk factors and their effects on the decision to treat hypertension: evidence based review. **BMJ**, v. 322, n. 7292, p. 977-980, 2001.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. Redox signaling in hypertension. **Cardiovasc Res**, v. 71, n. 2, p. 247-258, 2006.

PEYTON, K. J. et al. Compound C Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration in an AMP-Activated Protein Kinase-Independent Fashion. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 338, n. 2, p. 476-484, 2011.

POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

PÓVOA, R. et al. I Posicionamento Brasileiro sobre Combinação de Fármacos Anti-Hipertensivos. **Arq Bras Cardiol**, v. 102, p. 203-210, 2014.

POWIS, G. et al. Wortmannin, a Potent and Selective Inhibitor of Phosphatidylinositol-3-kinase. **Cancer Res**, v. 54, n. 9, p. 2419-2423, 1994.

RAPOSO, G. et al. Redistribution of muscarinic acetylcholine receptors on human fibroblasts induced by regulatory ligands. **Biol Cell**, v. 60, n. 2, p. 117-123, 1987.

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 981-990, 2012.

REES, D. D. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **Br J Pharmacol**, v. 101, n. 3, p. 746-752, 1990.

RIBEIRO, A. L. P. et al. Cardiovascular Health in Brazil: Trends and Perspectives. **Circulation**, v. 133, n. 4, p. 422-433, 2016.

ROCHA, A. P. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Acai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascul Pharmacol**, v. 46, n. 2, p. 97-104, 2007.

ROZENGURT, E.; SOARES, H. P.; SINNET-SMITH, J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. **Mol Cancer Ther**, v. 13, n. 11, p. 2477-2488, 2014.

RUBIN, D.; ORTON, C. G. The Radiation Biology of the Vascular Endothelium. **Medical Physics**, v. 28, n. 2, p. 288-288, 2001.

RUCKSTUHL, M. et al. Flavonoids are selective cyclic GMP phosphodiesterase inhibitors. **Biochem Pharmacol**, v. 28, n. 4, p. 535-538, 1979.

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 90, n. 15, p. 7240-7244, 1993.

SARBASSOV, D. D. et al. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098-1101, 2005.

SAUSBIER, M. et al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. **Circ Res**, v. 87, n. 9, p. 825-830, 2000.

SCHINI-KERTH, V. B. et al. Nutritional improvement of the endothelial control of vascular tone by polyphenols: role of NO and EDHF. **Pflugers Arch**, v. 459, n. 6, p. 853-862, 2010.

SCHINI-KERTH, V. B. et al. Vascular protection by natural product-derived polyphenols: in vitro and in vivo evidence. **Planta Med**, v. 77, n. 11, p. 1161-1167, 2011.

SCHMIDT, P. et al. Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase. **Eur J Pharmacol**, v. 468, n. 3, p. 167-174, 2003.

SCHUBERT, R. Isolated Vessels. In: DHEIN, S.; MOHR, F., *et al* (Ed.). **Practical Methods in Cardiovascular Research**: Springer Berlin Heidelberg, 2005. cap. 12, p.198-211.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, F. M. et al. Differences in functional and structural properties of segments of the rat tail artery. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 5, p. 416-423, 2008.

TANKO, L. B.; MATROUGUI, K. Can we apply results from large to small arteries? **Circ Res**, v. 90, n. 5, p. e68, 2002.

TATESON, J. E.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets. **Prostaglandins**, v. 13, n. 3, p. 389-397, 1977.

TOUYZ, R. M. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. **Hypertension**, v. 51, n. 2, p. 172-174, 2008.

TOWLER, M. C.; HARDIE, D. G. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. **Circ Res**, v. 100, n. 3, p. 328-341, 2007.

TRAN, T. M.; GIANG, N. M. Changes in blood pressure classification, blood pressure goals and pharmacological treatment of essential hypertension in medical guidelines from 2003 to 2013. **IJC Metab Endocr**, v. 2, p. 1-10, 2014.

TURKO, I. V. et al. Inhibition of Cyclic GMP-Binding Cyclic GMP-Specific Phosphodiesterase (Type 5) by Sildenafil and Related Compounds. **Mol Pharmacol**, v. 56, n. 1, p. 124-130, 1999.

V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 89, p. e24-e79, 2007.

VALTCHEVA, N. et al. The commonly used cGMP-dependent protein kinase type I (cGKI) inhibitor Rp-8-Br-PET-cGMPs can activate cGKI in vitro and in intact cells. **J Biol Chem**, v. 284, n. 1, p. 556-562, 2009.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, p. I-III, 2010.

WALDMAN, S. A.; MURAD, F. Cyclic GMP synthesis and function. **Pharmacol Rev**, v. 39, n. 3, p. 163-196, 1987.

WAN, X. et al. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. **Oncogene**, v. 26, n. 13, p. 1932-1940, 2006.

WILCOX, C. S.; PEARLMAN, A. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. **Pharmacol Rev**, v. 60, n. 4, p. 418-469, 2008.

WILLIAMS, D. L., JR. et al. Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular smooth muscle cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, n. 23, p. 9360-9364, 1988.

XU, L.; LIU, Y. Administration of telmisartan reduced systolic blood pressure and oxidative stress probably through the activation of PI3K/Akt/eNOS pathway and NO release in spontaneously hypertensive rats. **Physiol Res**, v. 62, n. 4, p. 351-359, 2013.

YAFFE, M. B. et al. A motif-based profile scanning approach for genome-wide prediction of signaling pathways. **Nat Biotech**, v. 19, n. 4, p. 348-353, 2001.

YILDIZ, O.; SEYREK, M.; GUL, H. Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery. In: ARONOW, W. S. (Ed.). **Artery Bypass**. InTech, 2013. cap. 15, p.546.

YOSHIDA, M. et al. Effect of the NO scavenger carboxy-ptio on endothelium-dependent vasorelaxation of various blood vessels from rabbits. **Life Sci**, v. 62, n. 3, p. 203-211, 1997.

ZHANG, W. et al. Direct Renin Inhibition With Aliskiren Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Nitric Oxide Synthase Signaling in Spontaneously Hypertensive Rats. **J Am Heart Assoc**, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2014.

ZHOU, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J Clin Invest**, v. 108, n. 8, p. 1167-1174, 2001.

ZHU, Y. et al. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. **Clin Chem**, v. 57, n. 11, p. 1524-1533, 2011.

ZIBERNA, L. et al. The endothelial plasma membrane transporter bilitranslocase mediates rat aortic vasodilation induced by anthocyanins. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 23, n. 1, p. 68-74, 2013.

ANEXO – Procedimento metodológico para desenvolvimento do processo extrativo e caracterização fitoquímica dos extratos de *Enterpe edulis* Mart.

As metodologias desenvolvidas para obtenção dos extratos de *Enterpe edulis* Mart. foram realizadas sob supervisão do professor Marcelo Maraschin, lotado no Departamento de Fitotecnia (FTI), do Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC); com colaboração de Aline Pereira e Mayara Breskovit, integrantes do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV). Consistiu da utilização de matérias-primas obtidas dos frutos de *Enterpe edulis* Mart. (i.e. polpas e cascas obtidas a partir de despolpa manual e despoldadeira de frutas), armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o início do processo de secagem.

Dois processos de secagem das biomassas foram testados para cada matéria-prima: liofilização e secagem em estufa. Após moagem, as matérias-primas foram novamente armazenadas sob refrigeração (-20 °C) até o início do processo extrativo.

Para o desenvolvimento das metodologias de extração, foi realizada uma avaliação fitoquímica preliminar através de maceração, à temperatura ambiente, que consistiu da exposição das biomassas amostrais (secas e liofilizadas) em três soluções extratoras (água, água e etanol, água e propilenoglicol) durante períodos de tempo predeterminados.

Para obtenção dos extratos, foram avaliadas três técnicas de extração assistida: micro-ondas, ultrassom e ultrapressão. A Extração Assistida com Micro-ondas (EAM) consistiu da utilização de um aparelho convencional e mistura de 1 g da biomassa amostral em 9 g de duas soluções extratoras (solução hidroalcoólica 50% ou água destilada). A mistura resultante foi irradiada com micro-ondas à frequência de radiação de 2,45 GHz durante três ciclos de 5 segundos, com intervalo de 60 segundos entre cada ciclo. As moléculas polares da biomassa amostral, ao absorverem a radiação penetrante, promovem um superaquecimento interno da matriz celular, levando a perda de umidade por evaporação e ruptura de membrana, com liberação dos compostos que se solubilizam nas soluções extratoras.

Para Extração Assistida com Ultrassom (EAU), foi utilizado um banho de ultrassom termostatizado a 25 °C e misturado 1 g da biomassa amostral em 9 g de duas soluções extratoras (solução hidroalcoólica 50% ou água destilada). A mistura resultante foi sonicada à frequência e densidade ultrassônica de 40 kHz e 150 W, respectivamente, durante 1, 3 ou 4 minutos. As ondas ultrassônicas difusíveis levaram ao rompimento

das paredes celulares da biomassa amostral, com liberação dos compostos que se solubilizaram nas soluções extratoras.

Para Extração Assistida com Ultrapressão (EAP), foi utilizado célula de aço inoxidável acoplada a um sistema de geração de pressão e misturado 1 g da biomassa amostral em 9 g de uma solução extratora (solução hidroalcoólica 50%). A mistura resultante foi submetida à pressão hidráulica de 580 kgf/cm² durante 60, 120, 180 ou 240 minutos. A alta pressão, ao interferir nos mecanismos de permeabilidade celular por promover diferenças de pressão entre os meios intra e extracelular, levou à difusão dos compostos celulares da biomassa amostral que se solubilizaram na solução extratora.

A eficiência das metodologias desenvolvidas para extração foi monitorada por espectrofotometria UV-visível (UV-Vis). Os extratos obtidos foram filtrados a vácuo e avaliados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais, conforme metodologia descrita por Randhir et al. (2002), com a utilização do reativo de Folin-Ciocalteu em espectrofotômetro a 725 nm. Foi utilizada curva-padrão (ácido gálico - 100 µg/mL - 1000 µg/mL - $y = 0,0018x$, $r^2 = 0,99$) para quantificação dos compostos fenólicos e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico/g de biomassa seca. As análises foram realizadas em triplicata e os conteúdos médios de compostos fenólicos totais foram comparados através da análise de variância (ANOVA), com auxílio do software GraphPad InStat versão 3.05 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos). Os extratos obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Extratos de *Euterpe edulis* Mart. obtidos das técnicas com micro-ondas, ultrassom e ultrapressão

Técnica	Extrato	Solvente extrator	Tempo de ext. (min)	Fenólicos totais (mg/mL)	Rendimento de extração (mg/mL)
Micro-ondas (EAM)	1.0	EtOH 50%	Cíclico	0,94	23,6
	2.0	H ₂ O	Cíclico	2,63	26,3
Ultrassom (EAU)	1.1	EtOH 50%	1	2,54	19,0
	1.4	EtOH 50%	4	2,13	16,3
	2.1	H ₂ O	1	1,70	13,6
	2.3	H ₂ O	3	1,78	17,2
	2.4	H ₂ O	4	1,63	21,8
Ultrapressão (EAP)	1.60	EtOH 50%	60	3,54	17,7
	1.120	EtOH 50%	120	3,80	30,2
	1.180	EtOH 50%	180	6,30	18,3
	1.240	EtOH 50%	240	2,30	23,8

O sistema de nomeação dos extratos obtidos adotou um código literal e numeral. O código literal, “EAM, EAU ou EAP”, designa a técnica de extração assistida às quais os extratos foram submetidos (EA = Extração Assistida, M = Micro-ondas, U = Ultrassom e P = Ultrapressão). O código numeral, composto por dois números separados por um ponto, indicam o solvente e tempo de extração da técnica correspondente. O primeiro número, a esquerda do ponto, identifica o solvente extrator utilizado na técnica, podendo ser 1 ou 2 (1 = EtOH 50% ou 2 = H₂O). O segundo número, a direita do ponto, designa o tempo de extração, com “0” indicando um tempo de extração cíclico e valores acima de zero indicando um tempo de extração linear, expresso em minutos.